

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Farmacología**



**Efectos de la inhibición del intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  sobre la  
isquemia miocárdica en el corazón de conejo**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Pedro Salinas Hernández**

**Director**

**Santos Barrigón Vázquez**

**Madrid 2004**

**ISBN: 978-84-8466-965-4**

**© Pedro Salinas Hernández, 1992**

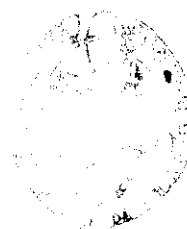


\* 5 3 0 9 5 7 7 8 2 4 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**EFFECTOS DE LA INHIBICION**  
**DEL INTERCAMBIO  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$**   
**SOBRE LA ISQUEMIA MIOCARDICA**  
**EN EL CORAZON DE CONEJO**

**Pedro Salinas Hernández    Madrid, 1992**



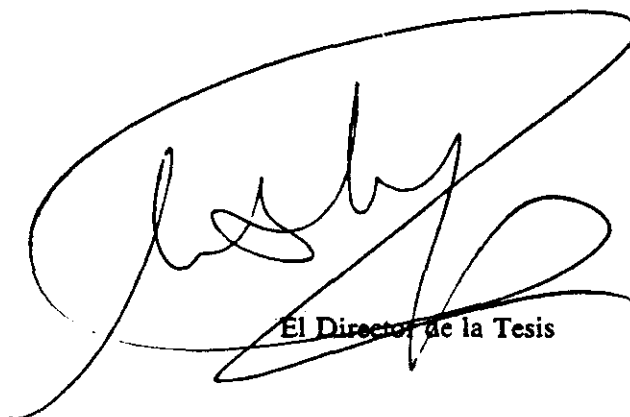
ARCHIVO

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Como Director de la Tesis Doctoral presentada por D. PEDRO SALINAS deseo expresar formalmente que los estudios experimentales descritos en dicha memoria han sido realizados bajo mi dirección y que ésta reúne, a mi leal saber y entender, las condiciones exigibles para poder ser presentada y defendida públicamente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo y rubico en Madrid a diez y siete de Diciembre de mil novecientos noventa y uno.

V.º B.º  
EL TUTOR (2)



El Director de la Tesis

Fdo.: \_\_\_\_\_

(fecha y firma)

N.I.F.:

Fdo.: Dr. S. Barrigón

(fecha y firma)

N.I.F.: 12202353 W

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

EL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

INFORMA:

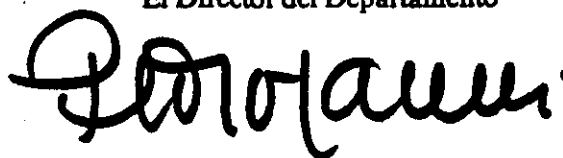
Favorablemente la presentación, exposición y defensa del Proyecto de trabajo presentado por D. PEDRO SALINAS HERNANDEZ y dirigida por el Dr.D. Santos Barrigón Vazquez, dado que reúne las condiciones académicas y científicas requeridas para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 20 de Diciembre, 1991

Fecha reunión  
Consejo Departamento

18.12.1991

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. P. Lorenzo

(fecha y firma)

A Rosa con todo mi cariño

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo ha sido realizado en el Dto. de Farmacología de la Ftad. de Medicina de la Univ. Complutense de Madrid bajo la dirección del Dr. Santos Barrigón Vázquez, a quién deseo expresar mi gratitud por su amistad, estímulo y apoyo constante. El ha sido parte fundamental de este trabajo.

También deseo expresar mi gratitud al resto de componentes del equipo de trabajo: M<sup>a</sup>. Dolores Pérez Pérez y Rafael Fernández-San Pablo por la cooperación en aspectos fundamentales del trabajo.

A la Dra. Laura Lastra Santos que dedicó parte de sus últimos meses de vida académica al estudio electrofisiológico de estos fármacos.

Al Dr. Jesús Fernández Tresguerres del Dto. de Fisiología de la Ftad de Medicina de la UCM por habernos permitido utilizar el microscopio electrónico Hitachi HU-12A y, especial reconocimiento al Dr.

Pablo Gil Loyzaga del Dto. de Anatomía de esta Ftad. por la dirección del estudio electromicroscópico.

Al Dr. Miguel Arroyo del Servicio Central de Análisis Clínicos del Hospital Universitario S. Carlos quién facilitó la determinación analítica de calcio mediante espectrometría de absorción atómica.

Los estudios que han permitido la elaboración de esta tesis han sido posibles gracias a una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS - 86814).

# INDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCION.....	1
I. ISQUEMIA MIOCARDICA.....	2
I.1. ALTERACIONES INICIALES (reversibles).....	8
I.1.a. Sobre contractilidad.....	8
I.1.b. Bioquímicas.....	9
I.1.c. De la homeostasis iónica.....	11
I.1.d. Cambios sobre el pH.....	14
I.1.e. Arritmias.....	14
I.1.f. Cambios estructurales.....	16
I.2. ALTERACIONES DEL PERIODO DE TRANSICION.....	16
I.3. ALTERACIONES TARDIAS (irreversibles).....	17
I.3.a. Sobre contractilidad.....	17
I.3.b. Bioquímicas.....	18
I.3.c. De la homeostasis iónica.....	19
I.3.d. Estructurales.....	19
I.4. ALTERACIONES RELACIONADAS CON LA REPERFUSION	20
I.4.a. Sobre contractilidad.....	20
I.4.b. Bioquímicas.....	22
I.4.c. Estructurales.....	23
I.5. PAPEL DEL CALCIO EN LA ISQUEMIA MIOCARDICA..	25
II. CONTROL DEL PH EN LA CELULA MIOCARDICA.....	32
II.1. PH EN LA CELULA MIOCARDICA.....	33
II.2. PH Y CONTRACTILIDAD CARDIACA.....	34
II.3. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN REGULACION DEL PH	36
II.3.a. Capacidad buffer intracelular.....	36
II.3.b. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .....	37
II.4. INHIBIDORES DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .....	46
II.5. OTROS INTERCAMBIADORES QUE REGULAN PH.....	51
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y METODOS	
Técnica del tabique interventricular del corazón del conejo, aislado y perfundido arterialmente. Procedimiento experimental.....	58

I. ESTUDIOS SOBRE CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.	
I.1. Experimentos control.....	65
I.2. Experimentos con Dimetil-Amiloride (DMA) en Tyrode.....	66
I.3. Experimentos con DMA sobre los efectos contractiles inducidos por el Cloruro amónico.	
I.4. Experimentos sobre contractilidad con DMA en Hepes.....	66
I.5. Experimentos con el Acido 4- acetamido- 4'- isotiocinato estilbeno- 2- 2' -disulfonico (SITS) y del SITS+DMA en Tyrode.....	67
II. ESTUDIOS ELECTROFISIOLOGICOS.	
Obtención y montaje de los músculos papilares del ventrículo derecho del corazón del conejo. Técnica de registro electro-fisiológico.....	68
II.1. Experimentos con DMA sobre los PA rápidos.	70
II.2. Experimentos con DMA sobre los PA lentos..	71
II.3. Experimentos con DMA sobre las alteraciones electrofisiológicas inducidas por la carga ácida.....	71
III. ESTUDIO SOBRE PARAMETROS DE CONTRACTILIDAD EN MIOCARDIO ISQUEMICO.	
III.1. Isquemia global. Técnica general y descripción del modelo. Experimentos control.....	72
III.2. Experimentos con DMA en miocardio isquémico.....	73
III.3. Experimentos con EIPA y DEA a dosis equipotentes a DMA $10^{-5}$ .....	73
III.4. Experimentos con SITS y con SITS + DMA en la isquemia miocárdica.....	73
III.5. Isquemia de bajo flujo.....	74
IV. EXPERIMENTOS SOBRE MOVIMIENTOS CON RADIOCALCIO.	
IV.1. Experimentos con DMA sobre movimientos de $^{47}\text{Ca}$ en la isquemia miocárdica.....	75
V. DETERMINACION ANALITICA DEL CONTENIDO DE CALCIO TOTAL.	
V.1. Técnica y experimentos con DMA e isquemia.....	77
VI. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.	
VI.1. Técnica y experimentos con DMA en isquemia.....	79
VII. ANALISIS ESTADISTICO.....	80



VIII. PRODUCTOS RADIACTIVOS, FARMACOS Y OTROS PRODUCTOS.....	81
RESULTADOS.....	82
DISCUSION.....	142
CONCLUSIONES.....	158
BIBLIOGRAFIA .....	161

## **INTRODUCCION**

## **I. ISQUEMIA MIOCARDICA.**

La isquemia miocárdica puede ser definida como la insuficiente perfusión sanguínea del tejido miocárdico. Más específicamente, como el desbalance entre el aporte de oxígeno y el requerimiento de éste, necesario para mantener la función miocárdica. La isquemia es debida a una disminución del riego del tejido cardiaco, que puede ser parcial o total.

La isquemia en el corazón humano ocurre, entre otros procesos, en situaciones patológicas tales como la angina de pecho o el infarto de miocardio. Además, se produce durante las manipulaciones terapéuticas en la cirugía cardiaca con circulación extracorpórea, así como tras la obtención y transporte de esta víscera para el trasplante (Bourdillon y Poole-Wilson , 1982).

El infarto de miocardio presenta una gran morbilidad en las naciones desarrolladas siendo una de las causas de mayor mortalidad. Así, por ejemplo, en Estados Unidos 1.500.000 de personas sufrieron infarto agudo de miocardio durante el año 1987 (National Center for health statistics, U.S). Debido a esto, se han optimizado modelos experimentales de isquemia en diversas especies animales con el objeto de poder estudiar los mecanismos fisiopatológicos que están involucrados, tendentes a

instaurar pautas terapéuticas racionales en el humano.

El funcionamiento del miocardio depende del oxígeno liberado desde los hematíes a través del flujo sanguíneo, que es necesario para obtener los enlaces de fosfato de alta energía. Estos se producen por la vía de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Esta vía es la única capaz de producir la cantidad adecuada de energía para mantener las necesidades miocárdicas a largo plazo.

Los objetivos que se pretenden obtener en terapéutica anti-isquémica guardan relación con la disminución del tamaño del infarto mediante la administración de fármacos de forma profiláctica, o mediante la administración de fármacos para preservar el correcto funcionamiento miocárdico después de esta situación.

Conviene destacar que en la célula miocárdica en condiciones de isquemia el déficit de perfusión sanguínea no sólo condiciona un déficit del aporte de oxígeno y nutrientes, sino que además, es incapaz de eliminar productos del metabolismo que le pueden ser tóxicos tales como el lactato, los protones o el dióxido de carbono. En condiciones fisiológicas éstos son eliminados vehiculizados por la sangre. Más aún, en esta situación se pueden formar radicales libres de gran reactividad que producen alteraciones funcionales y

estructurales y que, en condiciones fisiológicas, su degradación está asegurada mediante reacciones enzimáticas acopladas.

Por ello, las alteraciones que se producen durante la isquemia son complejas y distintas, en principio, a las observadas en modelos de anoxia e hipoxia (ausencia o déficit de oxígeno) aún cuando ésta acompaña a la isquemia.

En condiciones "in vivo" la necrosis miocárdica inducida por la isquemia es un evento multicausal en la que intervienen factores no estrictamente miocárdicos, como las alteraciones del endotelio de los vasos y reacciones mediadas por los elementos formes de la sangre. Más aún, con el paso del tiempo las lesiones isquémicas pueden sufrir procesos de reparación mediante fenómenos de cicatrización según se recoge en la figura 1.

En condiciones fisiológicas los iones de calcio son esenciales para el acoplamiento excitación-contracción del miocardio. En la isquemia miocárdica se pierde la homeostasis iónica dando lugar a un masivo incremento del calcio intracelular (Jennings y Shen, 1972), especialmente en las mitocondrias (Henry y cols., 1977). La existencia de un exceso de calcio en el citosol es el evento que, en la actualidad, se pone

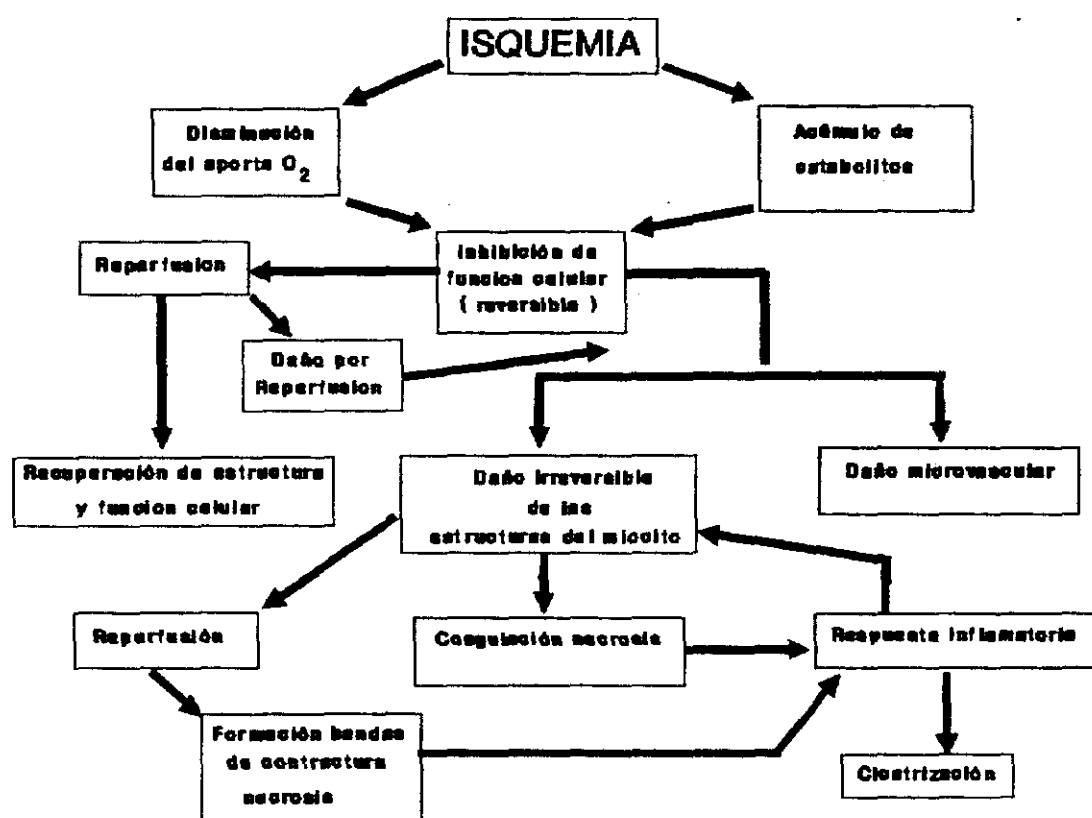


Figura 1. Componentes implicados en la isquemia miocárdica (modificado de Reitmer y Jennings, 1984).

en estrecha relación no sólo con el desarrollo sino también con la causa de la aparición de la necrosis miocárdica propiamente dicha.

Las alteraciones que aparecen en varios modelos experimentales de isquemia global, son proporcionales a la duración de ésta, así como a las características de la reperfusión. Con fines meramente académicos y con objeto de poder esquematizar su exposición posterior, estas pueden clasificarse como: INICIALES o reversibles, TARDIAS o irreversibles y las debidas a la REPERFUSION (figura 2).

En cualquier caso, y dependiendo del objetivo del estudio, se pueden descubrir en todos estos estadios alteraciones de contractilidad, bioquímicas, iónicas y morfológicas. Cualquiera de estas alteraciones están unívocamente relacionadas representando la constatación de alguna de ellas, una visión parcial de un único proceso a escala general (funcional, bioquímico o estructural).

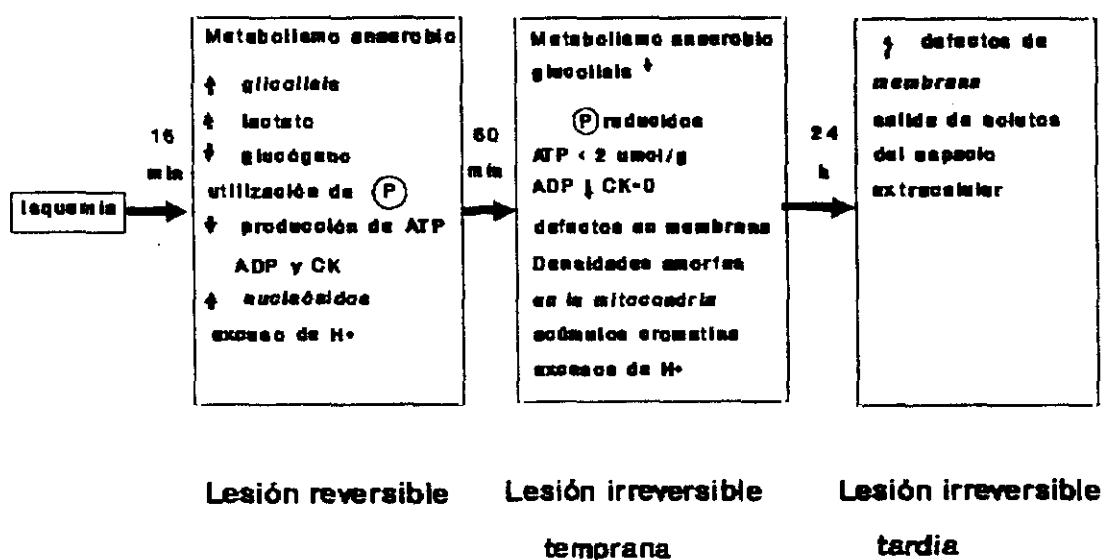


Figura 2. Evolución temporal de los efectos inducidos por la isquemia en el miocardio de perro (tomado de Jennings y cols., 1981).



### **I.1. ALTERACIONES INICIALES (reversibles).**

Se desarrollan aproximadamente durante los 15 primeros minutos de isquemia.

**I.1.a. Sobre contractilidad.** Se caracterizan por una desaparición gradual de la tensión desarrollada (amplitud contráctil) hasta llegar a anularse al final de esta fase (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982). La contractilidad se recupera (96%) si la preparación es reperfundida no más tarde de 15 minutos (Jennings y Reimer, 1981). La desaparición de la contractilidad podría guardar relación tanto con la hipoxia como con la acidosis, situaciones en las que se produce un efecto inotrope negativo, acortándose, además, la duración de la contracción.

La disminución de la fuerza de contracción es objetivable entre 6 y 10 segundos a partir del comienzo de la isquemia (Roos y cols., 1976). Aunque sería fácil atribuir este rápido descenso en la fuerza de contracción a la disminución del ATP en el miocito, ésta no parece ser sólo la causa ya que el descenso de ATP se realiza de forma progresiva y, en cualquier caso, es un fenómeno posterior (Covell y cols., 1967; Kanaide y cols., 1982).

La disminución de la contractilidad miocárdica guarda relación directa con dos importantes hechos. El primero de ellos es la relación cuantitativa

existente entre grado de isquemia y disminución de la contracción. El segundo hecho es la relación entre tiempo de isquemia y grado de reversibilidad tras la reperfusión. De gran transcendencia sería el identificar el conjunto de hechos que transforman el modelo reversible en irreversible, pero esto no está aún definido.

En condiciones in vivo los miocitos del corazón de perro pueden llegar a resistir hasta 18 minutos gracias al flujo colateral arterial. Este puede llegar a ser hasta el 12 % del habitual (Jennings y cols., 1969).

**I.1.b. Bioquímicas.** El evento más transcendente es la deplección de los enlaces de alta energía. De hecho, se ha descrito una disminución muy intensa de creatín-fosfato y una disminución del 65 % del ATP a los 15 minutos, produciéndose a su vez una disminución de la concentración de glucógeno (Jennings y cols., 1978; Jennings y Reimer, 1981). La energía requerida para el buen funcionamiento del miocardio incluye aquella necesaria para mantener el metabolismo basal celular, la activación eléctrica, la despolarización y repolarización de la membrana y la energía necesaria para realizar el trabajo mecánico, donde podemos incluir el desarrollo y mantenimiento de la tensión sistólica y la activación y desactivación del sistema contráctil.

La reserva de enlaces de fosfato de alta energía es limitada y por tanto depende de una fuente continua de  $O_2$  como sustrato metabólico. La mitocondria es la organela capaz de producir estos enlaces de alta energía en la lanzadera electrónica, en donde el oxígeno actúa como aceptor final de los electrones. Como ha podido comprobarse experimentalmente en el corazón de la rata mediante espectroscopía por resonancia magnética, ya 2 segundos después del cese de la perfusión miocárdica existe una disminución y posterior cese del transporte de electrones en la mitocondria (Whitman y cols., 1983). Además se aprecia desde el primer momento una reducción en el paso  $NAD \rightarrow NADH$  (Barlow y Chace, 1976; Barlow y cols., 1977).

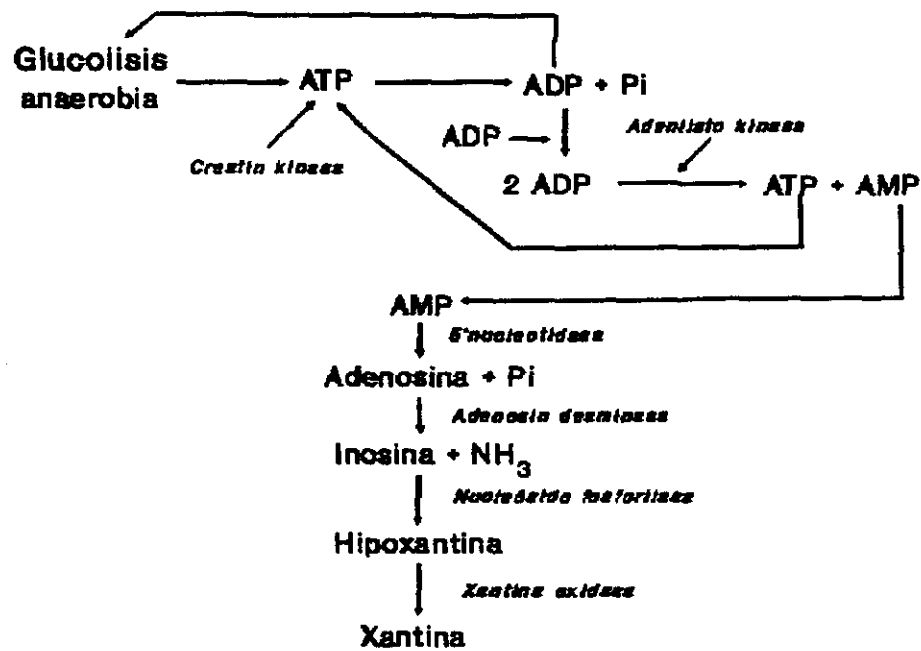
En esta fase de la isquemia, existe un incremento de concentración de ácido láctico, lo que sugiere que la síntesis de ATP en condiciones isquémicas se realiza a través de la vía anaerobia (Jennings y Reimer, 1981). Esta glicolisis anaerobia se empieza a desarrollar en el perro anestesiado entre los 18-30 segundos tras el comienzo de la isquemia. En los primeros momentos de ésta la actividad del enzima glucógeno fosforilasa es el paso limitante de la glicolisis anaerobia, produciéndose un gran incremento en su actividad a los diez minutos del comienzo de la isquemia (Dobson y Mayer, 1973).

A este tiempo existe una glicolisis intensa como lo demuestra el importante aumento de los niveles de

lactato y la disminución de la concentración de glucógeno. Durante este periodo la adenosina monofosfato es desfosforilada para la formación de adenosina. A los quince minutos del comienzo de la isquemia y por tanto de la utilización de la vía anaerobia ha desaparecido el 55 % del pool de nucleótidos de adenina (figura 3).

El corazón, en condiciones in vivo, presenta una importante reserva de energía en forma de triglicéridos. Debido a la lipólisis dependiente de un incremento de la liberación de catecolaminas, existe en condiciones isquémicas un incremento de ácidos grasos, acil coenzima A y acil-carnitina. Estas sustancias necesitan oxígeno para poder ser aprovechadas como fuentes de energía, y además, tienen un efecto depresor del miocardio isquémico debido a la inhibición de la translocasa del nucleótido de adenina lo que repercute en una disminución de la síntesis de energía.

**I.1.c. De la homeostasis iónica.** El  $K^+$  extracelular aumenta de forma gradual hasta llegar a un plateau que ocurre entre los 10 y los 15 minutos tras el inicio de la isquemia. A este tiempo, la concentración del  $K^+$  extracelular aumenta desde 4-5 mM a 14-15 mM, a la vez que el potencial de membrana disminuye de -82 mV



**Figura 3.** Ruta metabólica degradativa del ATP en anaerobiosis (Jenning y cols., 1983).

a  $-52 / -47$  mV, en experimentos realizados sobre corazón de cobayo en condiciones "in vitro" (Kléber, 1983). Este incremento extracelular de  $K^+$  ocurre tanto por la salida de este ión desde el interior celular como por una disminución del volumen extracelular.

En modelos experimentales de isquemia humana durante la realización de angioplastia transluminal, se ha demostrado que existe una elevación del  $K^+$  extracelular si la isquemia supera los 15 segundos, incrementándose la concentración del  $K^+$  en el seno venoso entre 0.18 a 1.55 mM sobre la concentración basal. Este incremento, que se obtuvo tras desinflar el balón de angioplastia, se pone en relación con el lavado del espacio extracelular tras la perfusión (Crake y cols., 1987).

La disminución de  $K^+$  del interior celular no va acompañada de una entrada simultánea de  $Na^+$  durante esta fase inicial de la isquemia, como cabría esperar (Kléber, 1983; Rau y cols., 1977). Para poder mantener un equilibrio iónico se produce una salida junto con el  $K^+$  de aniones intracelulares, tales como lactato y fosfato inorgánico. Esta pérdida de aniones inorgánicos resulta beneficiosa en situación de isquemia celular para disminuir la importante carga osmótica impuesta por el metabolismo anaerobio. En efecto, durante éste, se produce un catabolismo elevado de creatín fosfokinasa a creatina y fosfato y del glucógeno a intermediarios de la glicolisis anaerobia (Jennings y

cols. 1985).

El calcio está muy compartimentado en el interior celular y, por ello, resulta difícil obtener datos fiables de su concentración libre intracitosólica. Durante la fase inicial del proceso isquémico parece que no existe una variación significativa del  $\text{Ca}^{++}$  total intracelular (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982), aunque parece ser que lo que sí existe en esta fase es una redistribución interna entre los diferentes compartimentos celulares, como se ha demostrado, in vitro, en el corazón de conejo (Nayler, 1981).

**I.1.d. Cambios sobre el pH.** Durante los diez primeros minutos de isquemia el pH intracelular baja aproximadamente 0.8 unidades (Weiss y cols., 1984). Es conocido el efecto inotrope negativo directo que la acidosis causa sobre la contractilidad. Si bien hay autores que cuantifican esta disminución entre el 10 al 20 %, otros estudios obtienen unos valores cercanos al 40 % (Jacobus y cols., 1982). No obstante, gracias a la utilización de células miocárdicas desnudas, y al mantenimiento de concentraciones estables de  $\text{Ca}^{++}$ , se ha logrado establecer la existencia de una relación directa entre la disminución de pH y contractilidad cardíaca (Fabiato y Fabiato, 1978).

**I.1.e. Arritmias.** La relación entre niveles séricos de potasio y las arritmias ha ido incrementando el interés de

los investigadores. Así, en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio se ha establecido la existencia de una relación inversa entre niveles séricos de  $K^+$  e incidencia de fibrilación ventricular. Más aún, la posibilidad de presentar fibrilación ventricular era 5 veces mayor en aquellos sujetos que a su llegada al hospital presentaban  $K^+$  sérico elevado (Nordrehaug y Von Lippe, 1983).

Estos mismos hechos han sido evidenciados en ratas macho. En éste modelo experimental, se han conseguido diferenciar dos periodos de diferente pronóstico. El primer periodo estaría comprendido entre 0 y 30 minutos del comienzo de la isquemia y el segundo entre 30 minutos y 4 horas. La relación inversa entre aumento de la concentración de  $K^+$  y la posibilidad de producirse fibrilación ventricular es mucho más marcada en el segundo periodo (Curtis y cols., 1985).

No hay que olvidar que durante la isquemia se produce una gran liberación de catecolaminas capaz de producir arritmias (reciente revisión en Janse, 1989).

La liberación de noradrenalina parece ser que en esta situación se produce por procesos no exocíticos (Schoming y cols. 1984; Carlsson y cols., 1986; Dorts y cols., 1987; Richardt y cols., 1990).



**I.1.f. Cambios estructurales.** En los quince primeros minutos de la isquemia miocárdica se producen cambios estructurales reversibles. Estos consisten en un edema poco intenso que afecta al sarcolema y a todas las organelas intracelulares incluida la mitocondria. Además existe una disminución de los depósitos de glucógeno, una relajación de las miofibrillas y un leve desplazamiento de la cromatina nuclear (Fukuhara, 1985).

## **I.2. ALTERACIONES DEL PERIODO DE TRANSICION.**

Existe gran dificultad para precisar cuales son los cambios funcionales, estructurales y/o bioquímicos que nos permitan establecer la existencia de un daño celular irreversible, ya que estos cambios forman parte de una cadena sucesiva de acontecimientos que van a tener como final la muerte celular.

En cualquier caso, la disminución de contractilidad no es sinónimo de muerte celular puesto que es bien conocido que tras una isquemia de 15 a 40 minutos, existe una recuperación sustancial de contractilidad tras la reperfusión.

En el miocardio de perro en condiciones de isquemia, in vivo, se han llevado a cabo estudios mediante microscopía óptica para definir este proceso (Jennings 1980). En estos experimentos, se ha determinado un

intervalo amplio de tiempo (entre 20-40 minutos) en el cual las alteraciones que ocurren en la célula miocárdica llevan a lo que se denomina "punto sin retorno".

Jennings y cols. (1981), estudiaron las diferencias existentes entre las lesiones ocurridas tras isquemia entre 10 y 15 minutos de duración en el perro y las ocasionadas en el mismo animal tras 40 minutos utilizando como modelo la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior. Si bien encontraron lesiones que caracterizan cada periodo (edema, alteración de los depósitos de glucógeno, relajación de miofibrillas, desplazamiento leve de la cromatina nuclear), no es menos cierto que en ambas situaciones las lesiones estructurales o bioquímicas encontradas fueron muy similares y de difícil diferenciación entre sí.

### **I.3. ALTERACIONES TARDIAS (irreversibles).**

Son las alteraciones que se observan cuando la isquemia se prolonga más de 40-90 minutos.

**I.3.a. Sobre la contractilidad.** La preparación -que no se contrae- va aumentando su tensión de reposo de forma progresiva (Bourdillon y Poole-Wilson, 1981). Hay que destacar que esta contracción es especie dependiente; siendo máxima en la rata, menor en el conejo, menor aún en

el gato y nunca aparece en la rana (Henderson, 1983). Esta contractura se ha puesto en relación con el diámetro de la fibra muscular estudiada, y de ahí que sea especie dependiente (Fabiato, 1983), si bien esta hipótesis no se confirma en la rana, especie en la cual éste fenómeno no aparece.

**I.3.b. Bioquímicas.** A los 60 minutos del comienzo de la isquemia los niveles de ATP y de otros enlaces de alta energía han disminuido a valores del 6% de los existentes previamente a su inducción (Jennings, 1984). Esta disminución ocurre en parte por la pérdida asociada a la producción de energía por la vía de la glicolisis anaerobia y en parte por el malgasto que ocasiona la activación de ATP-asas calcio-dependientes. Además, contribuye a este efecto la acumulación de calcio en el interior de la mitocondria, que a su vez interfiere con la síntesis de enlaces de fosfato de alta energía (Nayler y cols., 1980).

Esta disminución de los depósitos de energía guarda relación inversa con la recuperación de la función mecánica o, lo que es lo mismo, relación directa con la intensidad del daño celular inducido por la isquemia (Ruigrok y cols, 1985; Poole-Wilson, 1982, 1983). Por ello, uno de los métodos experimentales para objetivar cardioprotección en la isquemia miocárdica es la medición de los niveles de ATP en presencia y ausencia de la

sustancia a estudio.

**I.3.c. De la homeostasis iónica.** Durante ésta disminuyen lenta pero progresivamente las concentraciones de  $K^+$  intracelular con incremento paralelo de las concentraciones de  $Na^+$  (Weiss y Shine, 1982). Las alteraciones del  $Ca^{++}$  y del  $Na^+$  se trataran de forma más detallada en un epígrafe posterior (I.5).

**I.3.d. Estructurales.** Cuando existen largos periodos de isquemia los cambios estructurales ya comentados se agravan de forma importante. La cromatina nuclear se agrega en acúmulos alrededor de la membrana nuclear. Los depósitos de glucógeno disminuyen de forma muy severa. Se produce un importante edema intramitocondrial que acompaña a un gran edema en el resto de la célula miocárdica.

Dos hechos estructurales de gran importancia nos permiten diferenciar el daño miocárdico irreversible ocasionado por la isquemia de larga evolución: desarrollo de densidades amorfas en la matriz de la mitocondria (depósitos de fosfato cálcico ) y la apreciación de hendiduras en el plasmalema (Jennings y Ganote, 1974, 1975; Jennings y Hawkins, 1980).

#### **I.4. ALTERACIONES RELACIONADAS CON LA REPERFUSION.**

En el miocardio isquémico la reperfusión produce, de forma sorprendente, un daño irreversible y extenso: la denominada "paradoja del oxígeno" (Jennings y Reymers, 1981).

**I.4.a. Alteraciones sobre la contractilidad.** A nivel de la tensión de reposo y tras la reperfusión, el fenómeno de contractura aumenta súbitamente y se hace máximo en los primeros minutos tras el comienzo de ésta. Posteriormente disminuye hasta alcanzar un nivel similar de contractura previo al momento de la reperfusión (aproximadamente hacia los 30 min.; Bourdillon y Poole-Wilson, 1981, 1982).

Esta contractura tras la reperfusión pudiera estar en relación con una entrada de calcio desde el exterior celular ya que la cantidad total de  $\text{Ca}^{++}$  aumenta (Grinwald, 1982). No se conoce con certeza el mecanismo que permite la entrada a los iones de  $\text{Ca}^{++}$  durante el estadio inicial de la reperfusión. En efecto, se ha demostrado que los fármacos inhibidores de los canales lentos del  $\text{Ca}^{++}$  son incapaces de disminuir por acción directa el paso de este catión al interior celular y, por tanto, no parecen que, a concentraciones terapéuticas y actuando exclusivamente sobre las células miocárdicas, puedan jugar ningún papel protector en condiciones "in vitro" (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982).

La contractura guarda relación con la unión permanente del calcio a la troponina C. Ello se produce tanto por falta de su recaptación por parte del retículo sarcoplásmico (por deplección energética) así como por el aumento del calcio intracitosólico (Nayler, 1981). El fallo funcional del retículo sarcoplásmico podría, además, estar en relación tanto con la acidificación del medio intracelular como con la formación de radicales libres, altamente reactivos, que podrían alterar morfológica y funcionalmente este sistema (Hess y cols, 1981).

Se ha descrito que las vías metabólicas más probables que podrían estar relacionadas con la génesis de radicales libres, serían las involucradas en la transformación de hipoxantina a xantina, mediante la xantina-oxidasa (Jones y cols, 1976). Sin embargo evidencias experimentales indican que la inhibición por alopurinol de la xantina-oxidasa no protege frente al daño isquémico en el miocardio de perro (Reimer y cols., 1985).

Estudios realizados sobre el miocardio de conejo mediante resonancia magnética en condiciones "in vivo" han evidenciado que la generación de radicales libres se produce mayoritariamente en los primeros minutos de la reperfusión. Cuando la reperfusión se realiza utilizando líquido nutricio oxigenado, la concentración de radicales libres aumenta aproximadamente 6 veces frente a experimentos control, mientras que si ésta es hipóxica no

existe aumento de tales sustancias. Estos radicales originaron una inhibición de la ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el miocardio de rata en condiciones "in vitro" (Zweier y cols. 1988; Bolli y cols., 1988).

Tras la reperfusión, la tensión desarrollada se recupera hasta un 25% de la inicial pre-isquémica (Poole-Wilson, 1981, 1982), y esta recuperación guarda estrecha relación inversa con el acúmulo de  $\text{Ca}^{++}$  existente en el miocardio y en la mitocondria (Henry y cols, 1977).

**I.4.b. Bioquímicas.** A pesar de que durante la reperfusión se aporten oxígeno y nutrientes a la célula miocárdica, el tejido es incapaz de recuperar los niveles de ATP precisos para mantener la homeostasis celular (Nayler y cols, 1980).

Ello se ha puesto en relación con el acúmulo intramitocondrial de  $\text{Ca}^{++}$  (Henry y cols., 1977), con la pérdida de sustratos para su síntesis (Jennings y Reimer, 1981) y con la inhibición de la adenil-translocasa de la membrana mitocondrial (Shrago, 1976). Esta inhibición se produce por los ácidos grasos de cadena larga originados en el citosol (Waldegiorgis y cols., 1983). Estos se forman por la acción de fosfolipasas, activadas por las grandes concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  intracitosólico. En estas condiciones, incluso admitiendo la posibilidad de la síntesis de ATP, su acúmulo intramitocondrial produciría la retroinhibición de su síntesis (Waldegiorgis y cols.,

1983; figura 4).

**I.4.c. Estructurales.** A microscopía electrónica se observa una desestructuración inicial del plasmalema (Jennings y cols., 1983). Posteriormente aparece edema intenso, hinchazón celular y la característica formación de bandas de contractura (Reimer y cols., 1977). El daño mitocondrial consiste en la aparición de un importante edema y densidades amorfas y granulares que se atribuyen a depósitos de fosfato cálcico (Jennings y cols., 1983).

Muchas de las alteraciones de las funciones celulares que ocurren durante la isquemia podrían contribuir a dañar la mitocondria y disminuir su funcionalidad, como los cambios de pH celular o de la homeostasis del  $\text{Ca}^{++}$ .

La alteración estructural de las mitocondrias tiene como consecuencia la pérdida de sus funciones, hecho de vital importancia ya que en ellas tiene lugar, como previamente se había indicado, la fosforilación oxidativa.



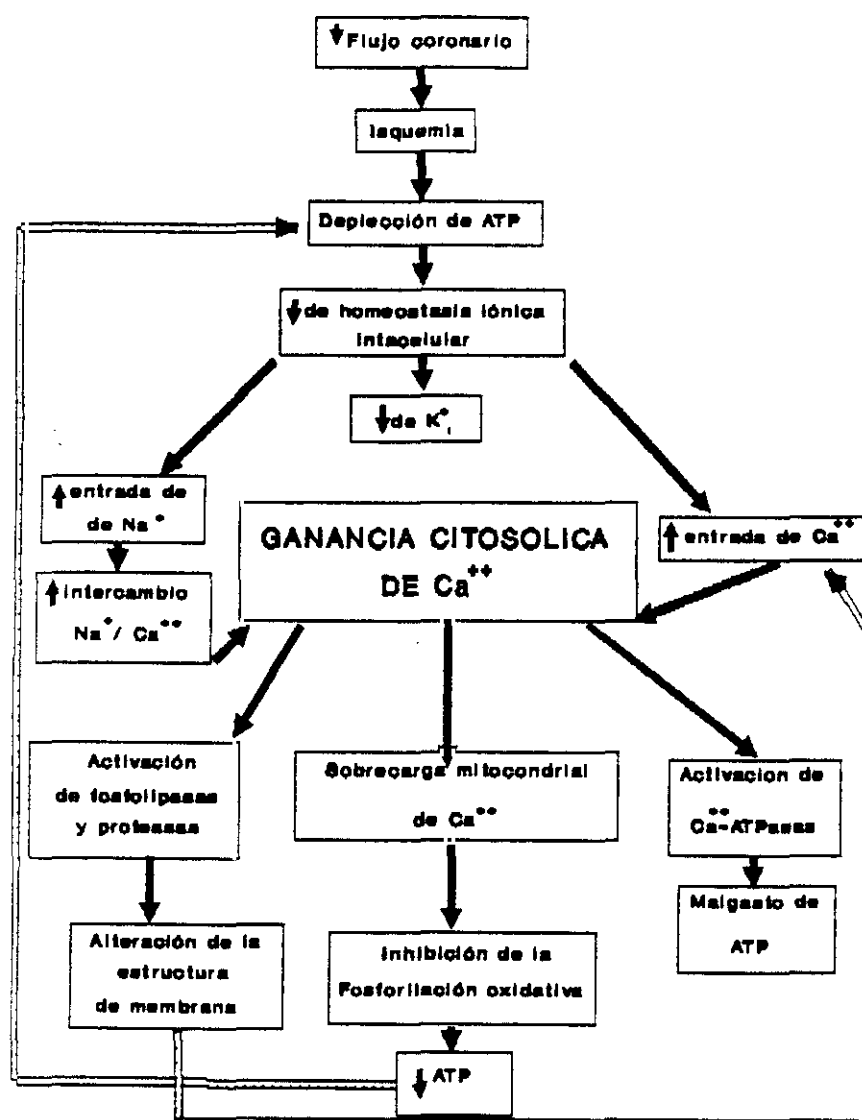


Figura 4. Alteraciones iónicas y metabólicas durante el proceso de la isquemia (tomado de Nayler, 1983).

Se ha propuesto que la liberación de macromoléculas tales como la creatin- fosfokinasa o la mioglobina podría ser un parámetro que indicaría la magnitud de desestructuración irreversible del plasmalema (Wende y cols, 1975).

#### **I.5. EL PAPEL DEL CALCIO EN LA ISQUEMIA MIOCARDICA.**

Si bien el mecanismo íntimo del daño celular no es bien conocido, los experimentos realizados hasta la actualidad permiten sugerir que es la alteración de la homeostasis iónica la causa y no la consecuencia de este daño. En efecto, tras periodos largos de isquemia existe una disminución de la concentración de  $K^+$  y  $Mg^{++}$  intracelular y un incremento de  $Na^+$  y  $Ca^{++}$  libre intracitosólico, este último principalmente tras la reperfusión.

La cantidad de  $Ca^{++}$  total que entra en la célula guarda estrecha relación con la duración y severidad de la isquemia (Shen y Jennings, 1972), temperatura a la que ésta se realiza y composición iónica del buffer que se perfunde (Nayler, 1981), así como del estado inotrópico del miocardio (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982). Esta ganancia neta de  $Ca^{++}$  intracelular ha sido considerado por algunos autores como el evento fundamental que desencadena el resto de las alteraciones (Figura 5).

El músculo cardiaco contiene en condiciones normales entre 2.5 y 4 mmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /Kg de peso seco (Shen y Jennings, 1972; Nayler y cols., 1980; Bourdillon y Poole-Wilson, 1981, 1982). El citosol mantiene unas concentraciones entre 0.1-10 micromolar. La concentración de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular es mucho más alta (en el rango milimolar). Debido a esta diferencia de concentración suele existir una tendencia a la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  desde el exterior celular que depende, entre otras cosas, de la integridad de la membrana celular, del buen funcionamiento de los canales iónicos y de la actividad de una hipotética ATP-asa localizada en el plasmalema capaz de expulsar  $\text{Ca}^{++}$  contra gradiente, del funcionamiento del retículo sarcoplásmico y de la buena función del intercambiador  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{++}$ . Este intercambiador se localiza en el plasmalema y facilita el intercambio entre iones de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^{+}$  (Langer, 1982).

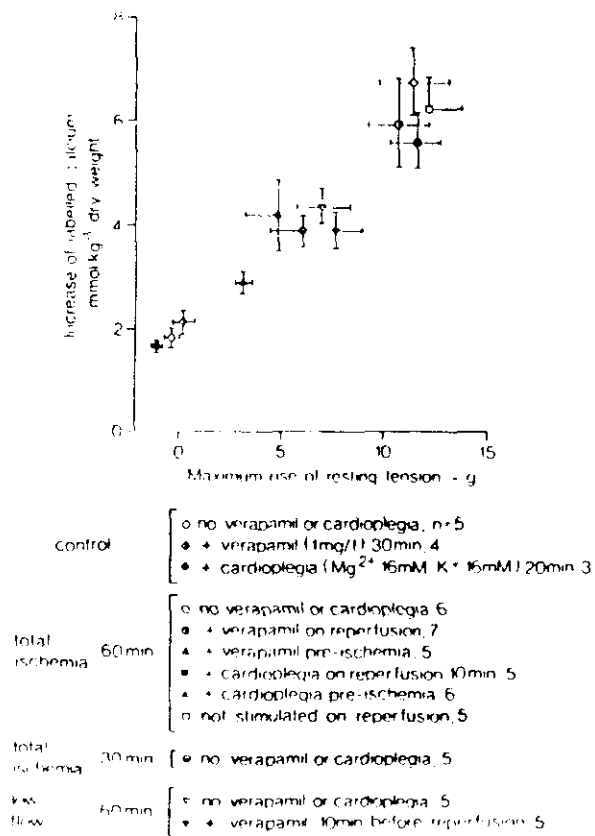
Con el potencial de acción penetra una cantidad de 50 micromoles/Kg a través de los canales lentos de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  (Beeler y Reuter, 1970), cantidad insuficiente para desarrollar la contracción en el corazón del mamífero, por lo que se ha propuesto que esta cantidad actúa como disparador (trigger) de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico (Fabiato y Fabiato, 1978).

El  $\text{Ca}^{++}$  dentro del miocito está muy compartimentado. La concentración libre intracitosólica es

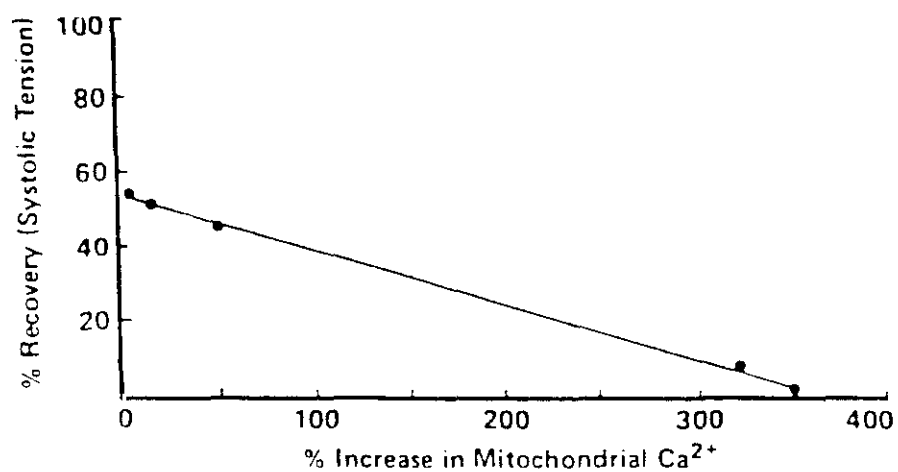
muy pequeña en relación a la de los compartimentos que la rodean y, por ello, existe gran dificultad para obtener una medición precisa de ésta. Es de gran importancia la medición de la concentración libre, ya que es realmente la fracción activa.

Si se produce isquemia, la cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  que puede acumular la célula cardiaca está limitada al  $\text{Ca}^{++}$  contenido en el líquido que rodea a las células afectadas. Por tanto en el proceso de isquemia sin perfusión, la ganancia de  $\text{Ca}^{++}$  es mínima o nula. Cuando existe perfusión con un líquido que contiene  $\text{Ca}^{++}$  la situación es diferente y se produce una importante entrada de este ión al interior celular. La magnitud de este proceso está íntimamente relacionado con las características de la isquemia en cuanto a duración y severidad.

La entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  (calcium overload) durante la perfusión va asociada a una peor recuperación de la función mecánica como ha sido demostrado en preparaciones aisladas de corazón de conejo (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982) y, más específicamente, la captación de calcio por parte de la mitocondria (Nayler, 1981; 1983; Figura 6).



**Figura 5.** Relación entre la ganancia de calcio marcado y la tensión de reposo (tomado de Bourdillon y Poole-Wilson, 1982)



**Figura 6.** Relación entre la recuperación de la función mecánica y el incremento de calcio mitocondrial, expresados en % (tomado de Nayler, 1983).

En condiciones fisiológicas, las vías de acceso del  $\text{Ca}^{++}$  al interior celular son varias: intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , difusión pasiva de calcio, entrada de calcio dependiente de ATP-*asas* y posiblemente por intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  mediado por bomba de  $\text{Na}^+$  (Philipson, 1985).

En condiciones de isquemia, inicialmente se estudió el papel de los canales lentos durante la reperfusión, con la hipótesis de que la entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  se producía a través de estos canales. Estudios posteriores han demostrado que la disminución de ATP que existe en la célula lleva consigo que muchos de estos canales sean no funcionales (Sperelakis y Schneider, 1976). Pero incluso, si todos los canales lentos fuesen funcionantes y trabajasen a pleno rendimiento, estudios de densidad de canales (Kostyuk y cols., 1981) y de la máxima conductancia por canal (Krishtal y cols., 1981) en otras estructuras han demostrado que éstos serían incapaces de transportar todo el  $\text{Ca}^{++}$  que penetra en la célula tras la reperfusión.

También se ha descrito que estos canales se inactivan cuando el  $\text{Ca}^{++}$  intracitosólico aumenta. Por último, el aumento de la concentración de hidrogeniones (acidosis) que ocurre durante la isquemia retrasa la reactivación de los canales lentos del  $\text{Ca}^{++}$  (Shimoni, 1981). Más aún, Bourdillon y Poole-Wilson (1982) han demostrado que el efecto cardioprotector que ejerce el

verapamil frente a la isquemia tiene más relación con la disminución del trabajo miocárdico que con una acción directa sobre flujos iónicos. Esto explica el porqué los antagonistas de los canales lentos del calcio no son efectivos "in vitro" cuando son administrados cuando la isquemia ya está instaurada o en el momento de la reperusión.

Por todo esto, podemos deducir que no es esta vía -salvo que se admita un aumento explosivo de su capacidad de transporte o la pérdida de sensibilidad a los factores antes mencionados- la que utiliza el calcio para entrar masivamente en la fibra cardiaca.

La entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  en el miocardio isquémico podría producirse gracias al intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . A pesar de la identificación de este sistema de intercambio tanto en la membrana miocárdica (Glitsch y cols., 1970) como en el retículo sarcoplásmico (Reeves y Sutko, 1979), poco se sabe aún acerca de su contribución en la entrada y salida del  $\text{Ca}^{++}$  en condiciones fisiológicas (Tillisch y cols., 1979; Siegl y cols., 1984). Ello, en parte, ha sido debido a la falta de sustancias que bloqueen de forma específica y con gran potencia este mecanismo de transporte iónico.

Dado que el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  no contribuye al acoplamiento excitación-contracción (toda vez que se



desacopla con antagonistas de los canales del calcio), se ha propuesto que este sistema contribuye en condiciones fisiológicas al proceso de relajación (Siegl y cols., 1984) y a mantener los niveles del  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico (Barry y Smith, 1982).

En condiciones de isquemia la deplección de ATP (entre otros motivos por la activación de ATP- $\text{Ca}^{++}$ -dependientes y por la disminución de la capacidad de fosforilización por parte de la mitocondria -ya sea por la acción directa del calcio sobre esta organela o por la formación aumentada de ácidos grasos de cadena larga, que inhiben la salida del ATP gracias a la acción de proteasas y fosfolipasas (Allen y cols., 1985) impide el funcionamiento de la ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente, y en condiciones en las que aumenta la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , se activaría el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (Reuter, 1974). Dado que este mecanismo no requiere gasto de energía podría aumentar el calcio de la fibra miocárdica en condiciones de isquemia.

## II. CONTROL DEL PH EN LA CELULA MIOCARDICA

En condiciones fisiológicas, el valor del pH interno ( $\text{pH}_i$ ) en células eucariotas, oscila en un rango de valores entre 7.0 y 7.4. Estos valores varían en función de la técnica de medición, de las condiciones experimentales y de la especie animal empleada para el estudio, cuando éste se realiza dentro de un rango de  $\text{pH}_o$  de 6.5 a 7.9 (Thomas, 1976; Moolenaar, 1986; Madshus, 1988). En la célula miocárdica este valor se sitúa aproximadamente alrededor de 7.1 (Ellis y Thomas, 1976; Roos y Boron, 1981).

Con el fin de obtener una medición exacta del  $\text{pH}_i$  y poder estudiar sobre modelos experimentales los diferentes efectos de los cambios de éste, se han diseñado diversas técnicas. Entre ellas podemos destacar: el estudio de distribución de sustancias ácidas o básicas fácilmente difusibles, y el uso de microelectrodos sensibles a pH. Más recientemente se ha introducido el estudio por resonancia magnética nuclear, que es capaz de detectar variaciones hasta de 0.01 unidades de pH (Roos y Boron 1981; Busa y cols., 1982).

Cada uno de los métodos anteriormente citados presenta ventajas e inconvenientes peculiares, por lo que la elección de uno de ellos dependerá del diseño experimental con el que se trabaje.

### II.1. PH EN LA CELULA MIOCARDICA.

En el músculo cardiaco , se ha objetivado que el valor de  $pH_i$  obtenido experimentalmente es siempre mayor que el esperado si los protones difundieran de forma pasiva a través del plasmalema de acuerdo a gradientes electroquímicos (Vanheel y cols., 1984). En efecto, aplicando de forma estricta la ecuación de Nernst se obtiene que la relación entre el potencial de membrana y pH queda establecido como:

$$V_m = 1000 (R \cdot T / F) \ln ([H^+]_o / [H^+]_i)$$

donde R y F son respectivamente las constante de los gases y la de Faraday, y T la temperatura en grados absolutos. Suponiendo la temperatura de trabajo habitual de 22° esta ecuación quedaría:

$$V_m = 59 (pH_i - pH_o)$$

Ello supondría que si la distribución de protones siguiera un equilibrio de Donnan, el pH intracelular debiera presentar un valor de 6.4. Este hecho sugiere que en la célula miocárdica deben existir mecanismos capaces de eliminar sustancias ácidas, para así, conseguir valores de pH óptimos para el mejor funcionamiento cardiaco, como los observados experimentalmente.

## II.2. PH Y CONTRACTILIDAD CARDIACA.

El valor del  $pH_i$  es un condicionante en el control de la contractilidad cardiaca (Vaughan-Jones y cols., 1985). Es un hecho conocido que la acidosis produce una importante disminución de la contractilidad cardiaca, mientras que la alcalosis produce incremento de la fuerza de contracción (Fabiato y Fabiato, 1978; Vaughan-Jones, 1987).

Si bien en un primer momento se atribuyó el descenso en la contractilidad únicamente a la disminución de  $pH$  externo, estudios posteriores han demostrado que los cambios que acontecen en el interior celular son los responsables directos de estas alteraciones contráctiles (Fry y Poole-Wilson, 1981; Vaughan-Jones y cols, 1987). No obstante, para que exista una disminución en el  $pH_i$  es necesario que se rebase la capacidad buffer del interior celular (Ellis y Thomas, 1976; Blatter y McGuigan 1991).

En el ventrículo del hurón, se ha descrito que las variaciones en el líquido de perfusión de 1 unidad de  $pH$  (PIPES, 6.4 o HEPES, 8.4) produjeron cambios mínimos en el  $pH_i$ , alrededor de 0.085 unidades, en sentido inverso al cambio de  $pH_o$  (Coray y McGuigan, 1983; Blatter y McGuigan, 1991). Por otra parte, en la fibra de purkinje de la oveja, los cambios de  $pH_i$  así obtenidos son

notablemente mayores (0.23 unidades, Deitmer y Ellis, 1980). Wallert y Frolich (1989) han descrito en el miocito de rata que en condiciones in "vivo" la variación apreciada mediante esta técnica es de 0.37 unidades de  $\text{pH}_i$ . Esto sugiere la existencia de variantes en el funcionamiento de los intercambiadores de  $\text{H}^+$  en las distintas especies, hecho a tener en cuenta al analizar los resultados de los diferentes experimentos.

Las variaciones de  $\text{pH}_i$  producen un cambio en la sensibilidad de las proteínas contráctiles hacia el  $\text{Ca}^{++}$ .

Así el aumento de  $\text{pH}_o$  produce un incremento de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{++}$  y la acidosis una disminución de ésta (Fabiato y Fabiato, 1978). Además, la disminución de  $\text{pH}_i$  produce una alteración de la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  (Bers y Ellis, 1982; Allen y cols., 1984) y un aumento de la cantidad necesaria de este catión para sobrepasar el umbral de excitación durante la contracción del miocito (Allen y cols., 1984). Así, la disminución del  $\text{pH}_i$  desde 7.4 hasta 6.2 produce un incremento de 5 veces en la cantidad necesaria de calcio libre intracelular requerido por los miofilamentos para producir el 50% de la tensión máxima desarrollada (Fabiato y Fabiato 1978; Fabiato, 1983).

Aunque en un principio se estableció que los protones podrían competir con los sitios específicos de unión del  $\text{Ca}^{++}$ , estudios posteriores han demostrado que la interacción entre ambos puede estar mediada por una

modificación alostérica de la afinidad de la proteína de la maquinaria contráctil con la que se une el  $\text{Ca}^{++}$ , la troponina C, mediada por los protones (Katz y Hecht, 1969; Ellis y McLeod, 1985).

### **II.3. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACION DEL PH.**

Si el  $\text{pH}_i$  experimental es mayor que el pH teórico que le correspondería de acuerdo con la ecuación de Nerst, ello indica la existencia de unos mecanismos internos capaces de realizar un ajuste de pH hasta unos niveles adecuados para la célula. Entre ellos, cabe destacar la capacidad buffer intracelular, hipotéticos sistemas de transporte activo de  $\text{H}^+$  y los sistemas de intercambio iónico en los que participan los protones (intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ ).

#### **II.3.a. Capacidad buffer intracelular.**

Podemos definir la capacidad buffer intracelular como la facilidad de la célula para resistir los cambios de  $\text{pH}_i$ , expresada en moles/litro. La capacidad buffer intracelular del miocito medida mediante la técnica de la carga ácida se aproxima a 73 mmol/l, pero este valor está influenciado por la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Por ello, si se bloquea mediante amiloride el

intercambio referido se obtienen unos valores aproximados de 20-30 mmol/l, que nos da idea de la verdadera capacidad buffer intracelular (Bountra y cols., 1990; Blatter y McGuigan, 1991).

### **II.3.b. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .**

La primera descripción de este intercambiador fue realizada en el borde en cepillo de las células renales de conejo (Murer y cols., 1976). Posteriormente, Deitmer y Ellis (1980) describieron a este intercambiador como un importante mecanismo de regulación del pH en la célula de Purkinje de oveja. Actualmente se tiene conocimiento de que este intercambiador EXISTE EN TODAS LAS CELULAS DEL ORGANISMO Y EN TODOS LOS MAMIFEROS ESTUDIADOS hasta el momento (Krulwich, 1983).

La acidosis intracelular es un factor determinante en la activación del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  como se ha demostrado en el miocito de pollo (Frelin y cols., 1984; Piwnicka-Worms y cols., 1985), en la célula de Purkinje de oveja (Dietmer y Ellis, 1980), en el miocito de conejo (Anderson y cols., 1990), y en otros tipos celulares no cardíacos. El intercambiador realiza el intercambio de  $\text{Na}^+$  extracelular por  $\text{H}^+$  intracelular, reduciendo de esta forma la carga ácida interna.

En ausencia de  $\text{Na}^+$ , o en presencia de muy bajas concentraciones de este catión en el líquido extracelular, el  $\text{Li}^+$  es susceptible de ser utilizado por este sistema, como ha sido demostrado en algunos tipos celulares como la célula de glía (Reiser y Duhm, 1982; Schmalzing y cols., 1985) o el músculo esquelético de rana (Abercrombie y cols., 1983).

En vesícula de sarcolema de corazón de perro, Pierce y Phillipson (1985) describieron que la captación de  $\text{Na}^+$  dependía del  $\text{pH}_o$ , siendo el efecto 50 alrededor de  $\text{pH}_o$  8.1 y máximo a  $\text{pH}_o$  8.6. La captación de  $\text{Na}^+$  tenía una  $V_{\text{max}}$  de 290 nmol/mg. min. en los cinco minutos iniciales y una  $K_{\text{Na}}$  de 3.5 mM. Esta actividad era más o menos específica del plasmalema. El  $\text{Li}^+$  inhibe la captación de  $\text{Na}^+$  con una concentración inhibitoria 50 de 3 mM en presencia de 1mM de  $\text{Na}^+$ .

La energía necesaria para conservar funcionando el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  proviene del gradiente de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_o/[\text{Na}^+]_i$ ) y, secundariamente, depende de la energía suficiente para mantener en funcionamiento la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que es la responsable de conservar este gradiente (Vigne y cols., 1984; Frelin y cols., 1984).

El modelo más usual de alteración del  $\text{pH}_i$  se basa en la técnica de la carga ácida. Para ello se perfunde un líquido nutricio conteniendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En la



solución que se perfunde existe un equilibrio entre el ión amonio y el amoniaco. Al infundir la solución, el amoniaco difunde de forma rápida y fácil al interior celular y se combina con los  $H^+$  internos, produciendo un incremento transitorio del  $pH_i$  hasta que se alcanza el equilibrio entre el amoniaco interno y externo. Al perfundir con solución carente de ión amonio, el equilibrio se invierte, liberándose en ese momento una gran cantidad de protones intracelulares, de forma proporcional a la concentración de iones amonio del líquido perfundido y por tanto, produciéndose una disminución del  $pH_i$  (Thomas, 1974; Roos y Boron, 1981; Jacobus y cols., 1982).

La actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  puede ser analizada esencialmente por tres vías diferentes: Por la medición del flujo de iones de  $Na^+$ , por la medición del flujo de  $H^+$  y por las variaciones ocasionadas sobre el  $pH_i$ .

El análisis cinético detallado del sistema de intercambio  $Na^+/H^+$  en diferentes células cardíacas ha demostrado que el sistema tiene las siguientes propiedades:

- 1) El intercambio  $Na^+/H^+$  es, al menos teóricamente, electroneutro y potencialmente reversible, con una estequiometría de 1:1 (Piwnicka-Worms y cols., 1985).
- 2) El aumento en la  $[Na^+]_o$  produce un incremento en la actividad del intercambiador. El valor de la  $K_m$  para el  $Na^+$

es de 58 mM (Wallert y Frolich, 1989). El  $\text{Li}^+$ , como ya se dijo, es el único catión monovalente capaz de sustituir al  $\text{Na}^+$  cuando éste no está presente y tiene una  $K_m$  de 8 mM.

3) El intercambiador es activo en la célula miocárdica de hurón para unos valores de  $\text{pH}_o$  de 6.4-8.6 cuando se utiliza técnica de carga ácida (Blatter y McGuigan, 1991). Cuando el  $\text{pH}_o$  está por encima de 8 se produce la máxima expulsión de  $\text{H}^+$  (Wallert y Frolich, 1989).

4) La actividad máxima media se obtiene cuando la concentración de  $\text{H}^+$  externa consigue alcanzar un valor de  $\text{pH}_o$  de 7.05. Por otra parte, cuando el  $\text{pH}_i$  sobrepasa 7.35 se produce una inhibición de la salida de  $\text{H}^+$  a través del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Piwnicka-Worms y cols., 1985; Wallert y Frolich, 1989).

Aronson y cols. (1983, 1985), han descrito en vesículas de la membrana plasmática de la célula renal, que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tiene regulación alostérica. Presenta en su cara citoplasmática 2 sitios de unión para los protones. Estos sitios, están separados entre sí y son funcionalmente independientes. Uno de ellos sería de tipo regulador, y cuando éste está ocupado realiza un cambio conformacional del intercambiador produciendo su activación. Una vez activo la unión de un protón al otro lugar sería capaz de producir la expulsión de éste.

Por su parte Wallert y Frolich (1989) han descrito en la célula miocárdica de rata, que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  depende de la concentración interna y externa de protones. Sus estudios mediante el análisis de la variación de la curva de expulsión de  $\text{H}^+$  respecto a la variación de  $\text{pH}_i$  empleando para ello la ecuación de Hill, tras la aplicación mediante la técnica de cargas ácidas con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , da un valor próximo a 3. Esto permite suponer que en este tipo celular exista una regulación por medio de 2 sitios de unión (transportador más sitio regulador), si bien no podemos descartar un sitio adicional de tipo regulador.

La  $[\text{Na}^+]_i$  tiene gran importancia en el nivel de la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  induce un incremento en la  $[\text{Na}^+]_i$  y una disminución del  $\text{pH}_i$  cuando el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  está inhibido por el amiloride o sus derivados (Grinstein y cols, 1984; Vaughans-Jones y cols., 1983).

También la inducción de alteraciones en el  $\text{pH}_i$  mediante la técnica de carga ácida produce al mismo tiempo cambios en la actividad interna de  $\text{Na}^+$ , de forma inversa a las variaciones de  $\text{pH}_i$  (Deitmer y cols., 1980; figura 7). Esta disminución de  $\text{pH}_i$ , tiene gran importancia en la célula miocárdica por el efecto de la acidosis sobre la disminución de la contractilidad (Fabiato y Fabiato, 1978; Vaughan-Jones y cols., 1983; Vaughan-Jones y cols.,

1987). También los cambios en la frecuencia cardiaca, o el uso de fármacos que alteren la  $[Na^+]_i$  pueden producir un descenso en el  $pH_i$  (Eisner y cols., 1983; 1987).

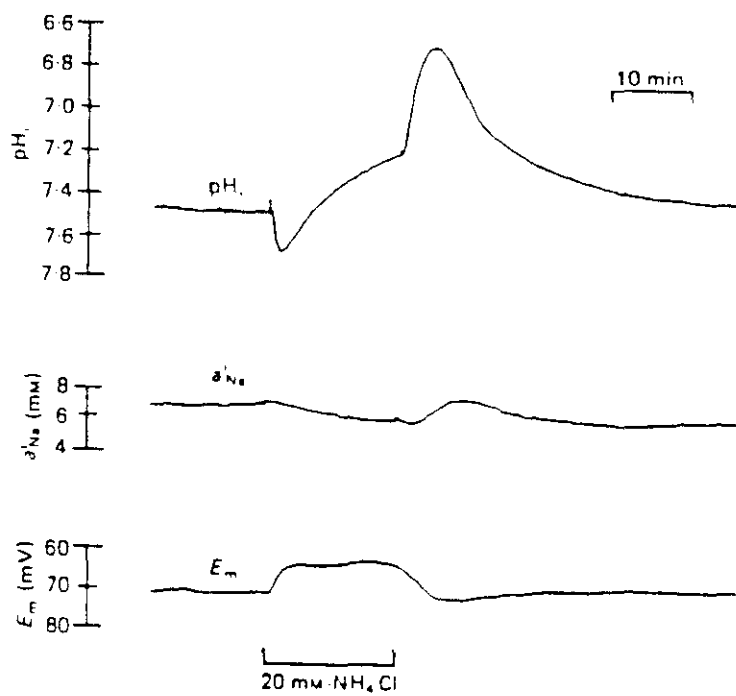


Figura 7. Efecto de la perfusión y posterior retirada de  $NH_4Cl$  (20mM) sobre la actividad interna de  $Na^+$  y el potencial de membrana (tomado de Deitmer y Ellis, 1980).

Es difícil evaluar el efecto aislado del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  puesto que la modificación del cociente  $[\text{H}^+]_o/[\text{H}^+]_i$  da lugar a variaciones en la concentración del  $\text{Na}^+$  dentro y fuera de la célula, por lo que la actividad de otros sistemas de intercambio también se ve modificada. Así, el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  puede a su vez producir un incremento de la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  gracias al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  a través del sarcolema (Bers y Ellis, 1982; Vaughan-Jones y cols., 1983).

Este incremento del  $\text{Ca}_i^{++}$  lleva consigo una disminución del  $\text{pH}_i$  (Kim y cols., 1987), que no parece estar en relación directa con interacción receptorial, sino con el incremento de la fuerza de contracción originado por el  $\text{Ca}^{++}$ , con el consiguiente incremento de ácido láctico por generación anaerobia (Ellis y McLeod, 1985) y de forma más importante, durante los procesos isquémicos por una disminución del ATP de la célula miocárdica (Tani y Neely, 1989; Steenberger y cols., 1987, 1990; Anderson y cols., 1990).

Empleando el modelo experimental de la carga ácida, la utilización de inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  aumenta la acidificación producida e inhibe la recuperación (Piwnicka-Worms y cols, 1985). Durante la infusión del ión amonio, se produce una disminución de la  $[\text{Na}^+]_i$  de 68 a 48 mmol/Kg de peso húmedo. Tras el cese de la infusión, se sobrepasa el nivel basal hasta 130 mmol/Kg. aproximadamente tras el lavado de ésta con solución buffer

(Piwnicka-Worms y cols, 1985). El amiloride (0.75 mmol/l) evita la elevación de la  $[Na^+]_i$  tras el lavado de la carga ácida (Blatter y McGuigan, 1991).

La reducción de la  $[Na^+]_o$  también influye en los valores de pH. Así, una disminución de la  $[Na^+]_o$  de 155 mmol/l a 5-15 mmol/l produce una disminución del  $pH_i$ , por producir una inversión del gradiente de  $Na^+$ , en el miocardio (Blatter y McGuigan, 1991). También los cambios en el  $pH_o$  influyen en el conductancia al  $Na^+$ , ya que la corriente de entrada del  $Na^+$  es máxima a un valor de  $pH_o$  de 8.6 (Pierce y Philipson, 1985).

No está aclarado si el sistema de intercambio  $Na^+/H^+$  es activo además en condiciones fisiológicas. Pérez y cols. (1990) han descrito que el derivado de amiloride, dietilamiloride (DEA) induce un importante efecto inotrope negativo cuando es administrado a preparaciones in "vitro" de septum interventricular de conejo perfundidas con HEPES (pH 7.4). Este efecto es dosis-dependiente y a la concentración de  $10^{-5}$  M induce una disminución de la tensión máxima desarrollada del 46% frente al control.

#### II.4. INHIBIDORES DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  es inhibido principalmente por el amiloride y sus derivados (figura 8). El amiloride es una base débil (3,5-diamino- 6-cloro-N-pirazidacarboxamida) que se comporta como un diurético por ser capaz de inhibir el transporte de  $\text{Na}^+$  en el epitelio renal de la parte distal de la nefrona (Eigler y cols., 1967).

Cuando se mantiene el pH en el rango fisiológico se comporta como un catión monovalente, presentando la carga positiva el fragmento amidinio. Es soluble en agua, y la máxima concentración que puede ser alcanzada se sitúa alrededor de 1.6 mM (Benos, 1982).

Si se utiliza a altas concentraciones además de inhibir el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de forma rápida y reversible, entre otras acciones, actúa también sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (Benos, 1982).

La potencia de este fármaco puede ser aumentada hasta 200 veces cuando se producen sustituciones en el grupo 5 amino (Vigne y cols., 1983). El análogo de amiloride más activo para lograr la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que se conoce es el 5-5'etil-isopropil amiloride (EIPA). Así, en cultivos de músculo esquelético de pollo a  $\text{pH}_0$  de 7.4, el amiloride presenta un

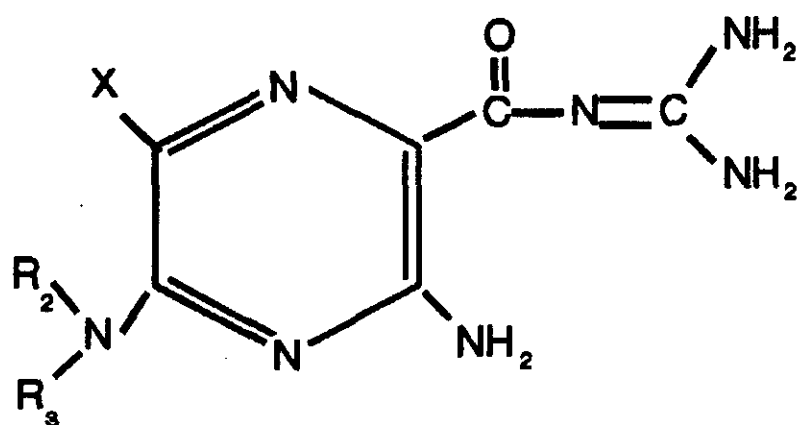


valor para  $K_{0.5}$  de 7  $\mu\text{M}$  para inhibir la entrada de  $^{22}\text{Na}^+$  (en un periodo de tiempo de 60 segundos) mientras que el EIPA tiene un valor de 0.05 (Vigne y cols, 1983).

El grupo guanidino de la molécula de amiloride es esencial para la actividad de la molécula. Este grupo reconoce lugares para el  $\text{Na}^+$  del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Vigne y cols., 1982). Por otra parte, el grupo 6-halo no parece que tenga importancia para su actividad. La sustitución en el carbono 6 del  $\text{Cl}^-$  por  $\text{I}^-$  no representa una sustancial variación en la  $K_{0.5}$  (Vigne y cols., 1983) (figura 8).

El EIPA presenta efectos despreciables sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Por contra, el benzamil y el diclorobenzamil, dos derivados del amiloride que tienen una sustitución en el grupo guanidino, se comportan como potentes pero poco selectivos inhibidores de este intercambio (Siegl y cols., 1984).

El amiloride es capaz de bloquear la ATP-asa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  en las células renales y cardíacas mientras que el EIPA sólo realiza esta acción a concentraciones superiores a 0.1 mM, y por tanto, se puede considerar que el EIPA es un inhibidor potente y selectivo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , sin que presente interferencia con otros sistemas de transporte catiónico de membrana (Frelin y cols., 1988).



	$R_2$	$R_3$	X	$K_{0.5}$ ( $\mu M$ )
Amiloride	H	H	Cl	7
	H	H	Br	6
	H	H	F	70
	H	H	I	5
	$C_6H_5-CH_2$	H	Cl	2
	$(CH_3)_2-CH-CH_2$	H	Cl	1
	$CH_3-(CH_2)_4-$	H	Cl	3
DMA	$CH_3-$	$CH_3-$	Cl	0.3
DEA	$CH_3-CH_2-$	$CH_3-CH_2-$	CL	0.1
EIPA	$CH_3-CH_2-$	$(CH_3)_2-CH-$	CL	0.05

**Figura 8.** Fórmula desarrollada del amiloride y alguno de sus derivados.  $K_{0.5}$  representa la concentración inhibitoria 50 sobre el intercambiador  $Na^+/H^+$  en células de músculo esquelético de pollo en cultivo (Vigne y cols., 1983).

## II.5. OTROS INTERCAMBIADORES QUE REGULAN PH.

La distribución de iones de  $\text{Cl}^-$  a través del sarcolema del músculo cardíaco no es un simple hecho pasivo conforme a los potenciales de membrana (Ladle y Walker, 1975; Vaughan-Jones, 1976; Spitzer y Walker, 1980). La actividad del  $\text{Cl}^-$  intracelular es aproximadamente de 20-30 mmol/l, 5 veces superior a lo que le correspondería en el equilibrio electroquímico. Vaughan-Jones (1979), ha descrito en la fibra de Purkinje de oveja la existencia de un intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  reversible y saturable, independiente del  $\text{Na}^+$ , que realizaría un intercambio de  $\text{Cl}^-$  extracelular por  $\text{HCO}_3^-$  intracelular de forma electroneutra (Vaughan-Jones, 1986).

Este sistema de intercambio es independiente del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y no se ve inhibido por los derivados del amiloride (Erlij, 1971; Candia, 1978), pero sí por los derivados de estilbenos disulfonados, tales como, 4-4'-diisocianato estilbeno 2,2'-ácido disulfónico (DIDS) y el 4 acetamido-4' isocianato estilbeno 2,2'-ácido disulfónico (SITS; Gonzalez y Clancy, 1981; Vaughan-Jones, 1986).

El mecanismo de intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  se ha puesto en relación con el control intracelular de  $\text{pH}_i$  principalmente cuando existe un alcalinización intracelular

(Russell y Boron , 1976). Si bien en algunos tipos celulares, como en la célula del epitelio del túbulo renal, esta regulación parece un hecho demostrado e importante (L'Allemain y cols., 1985; Tonnenssen y cols., 1987; Madshus y Olsnes, 1987; etc.) en la célula miocárdica existen indicios de que el intercambiador serviría para mantener un gradiente de  $\text{Cl}^-$  pero no actuaría de forma directa en el control de  $\text{pH}_i$  (González y Clancy, 1981).

**PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.**

La isquemia miocárdica da lugar a una acidosis intracelular que se desarrolla de forma casi instantánea tras el comienzo de la isquemia, progresando según se incrementa la duración de la misma.

El sistema más importante de extrusión de  $H^+$  es el intercambiador  $Na^+/H^+$ . La activación del sistema en este estado, en el que existe un bloqueo metabólico de la actividad ATP-asa  $Na^+/K^+$ , podría ser una de las vías importantes para la entrada de  $Na^+$  al interior celular. Este acúmulo de  $Na^+$  podría indirectamente activar el intercambio  $Na^+/Ca^{++}$  dando lugar a la entrada masiva de este catión ( $Ca^{++}$  overload), suceso característico de la isquemia miocárdica. Más aún, el bloqueo de este sistema durante 30 min. antes de la isquemia, podría inducir una hipotética acidosis (Pérez y cols., 1990) y se conoce desde hace tiempo que la ligera acidificación del miocito da lugar a una protección frente a los efectos deletéreos de la hipoxia (Bing y cols., 1973; Nayler y cols, 1979).

Los efectos del sistema de intercambio  $Na^+/H^+$  en la isquemia miocárdica no han sido bien caracterizados. Por ello, los objetivos iniciales de nuestro trabajo fueron:

1.- Caracterizar, en nuestras condiciones experimentales, la dosis óptima del derivado 5,5'-N dimetil sustituido del amiloride, DMA, que bloqueara el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo en condiciones no isquémicas.

2.- Estudiar el efecto sobre parámetros mecánicos que tales concentraciones de DMA pudieran producir sobre nuestra preparación.

3.- Estudiar la selectividad de la acción del DMA sobre miocardio, descartando otras posibles acciones mediante estudios de electrofisiología.

4.- Evaluar los efectos de la inhibición del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sobre la isquemia miocárdica producida en el septum interventricular aislado del corazón de conejo, analizando para ello los efectos sobre:

- las alteraciones morfológicas de la isquemia, mediante análisis a microscopía electrónica.

- los parámetros de contractilidad característicos

para evaluar efecto antiisquémico (máximo incremento de la tensión de reposo y % de recuperación de contractilidad tras 30 min de reperfusión).

- la captación total de calcio tras isquemia-reperfusión.

5.- Caracterizar la hipotética variación del contenido total de calcio tras la isquemia-reperfusión y estudiar las variaciones que el DMA pudiera originar sobre la cinética de captación del  $^{47}\text{Ca}^{++}$  en condiciones isquémicas y no isquémicas.



## **MATERIAL Y METODOS.**

## **Técnica del tabique interventricular del corazón del conejo, aislado y perfundido arterialmente.**

### **Procedimiento experimental.**

Los experimentos se realizaron en el tabique interventricular (septum) del corazón del conejo NZW (2,5-2,9 Kg) según la técnica descrita por Langer y Brady en 1968.

Tras heparinizar (2.000 U.I. i.v.) y matar a los conejos por sobredosificación de pentobarbital (120 mg, i.v.), inmediatamente se procedió a la apertura quirúrgica del tórax y extracción del corazón. Se colocó éste sobre la cara ventricular izquierda en un soporte para disección, procediéndose a la exéresis de las aurículas, así como de la porción externa de la pared ventricular derecha. Tras abrir la arteria coronaria izquierda, se identificó y canuló la arteria del tabique interventricular mediante una cánula de polietileno (Clay Adams, PE 50 -diam. ext de 1,09 mm, diam.int.0,38 mm-), en la que previamente se había moldeado una oliva terminal que impide su deslizamiento tras su colocación y sutura.

Los tabiques se perfundieron con solución nutriticia mediante una bomba peristáltica Gilson, mod. Minipuls HP4., de 4 vías, lo que permite cambiar el tipo de solución perfundida gracias a un juego de llaves de tres

pasos inserto en el sistema de perfusión, sin originar gradientes de flujo, presión o temperatura (figura 9).

Se desecharon aquellos tabiques inter-ventriculares en los que el tiempo transcurrido desde la inyección del barbitúrico y el inicio de la perfusión fue superior a 4 minutos.

Tras separar los músculos papilares situados en la cara derecha del tabique, la pared ventricular izquierda y el resto de tejido no perfundido, la preparación triangular resultante se montó fijándola por su base mediante unos fórceps en ambos lados y con el vértice superior unido a un transductor fuerza/desplazamiento (Grass, FT03), mediante un hilo de seda de sutura, según se aprecia en la figura 9.

El transductor se conectó a un polígrafo Grass, mod. 79D, con un módulo preamplificador D.C. Grass, mod. 7P1F, cuya señal amplificada se registró sobre papel y simultáneamente se obtuvo su derivada en el tiempo mediante la introducción de la señal (obtenida a través de la salida J6 del preamplificador) en un módulo diferenciador analógico Grass, 7P20.

Ello permitió, tras la adecuada calibración del equipo, el registro gráfico continuo tanto de la tensión desarrollada (g) como de la velocidad de desarrollo

de la tensión ( $dT/dt$ ; g/sec).

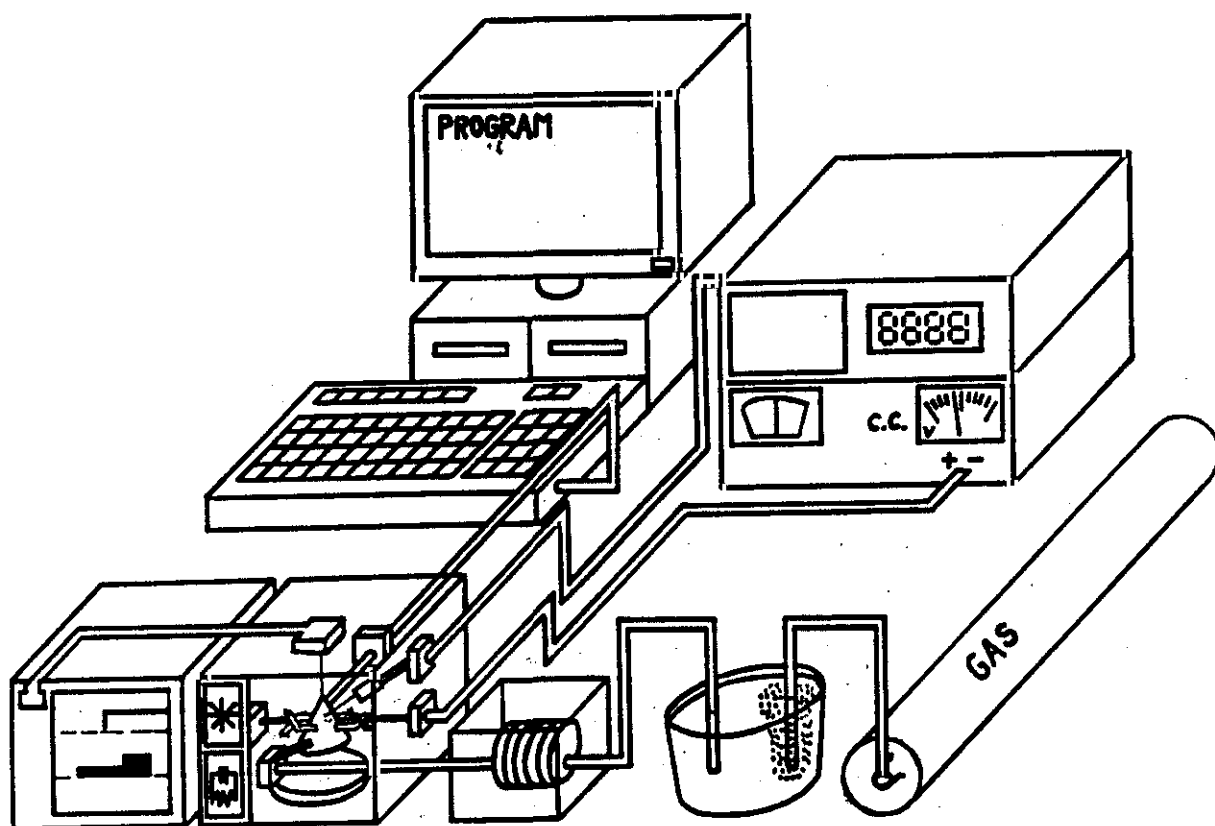


Figura 9. Esquema del montaje del septum inter- ventricular aislado y perfundido arterialmente.

A partir de los registros gráficos de la velocidad de desarrollo de la tensión se cuantificó el tiempo necesitado para alcanzar el pico de la contracción (tPC) midiendo el espacio entre el inicio de la contracción y el momento en el que la  $dT/dt$  se hacía cero, transformándolo a unidades de tiempo en función de la velocidad de registro. El tiempo total de contracción (ttC) fué cuantificado de forma similar, midiendo la distancia entre el inicio de la contracción y el momento en que la  $dT/dt$  volvía a hacerse 0.

La máxima velocidad de contracción ( $+dT/dt$  max) y relajación ( $-dT/dt$  max) se obtuvo midiendo la máxima amplitud de la onda a partir del valor de la línea base y fué transformada a g/sec gracias a la calibración interna del aparato de medida.

Los tabiques interventriculares se estimularon eléctricamente con pulsos rectangulares de 5 V y 5 msg. de duración, a una frecuencia básica de estimulación de 1 a 1,6 Hz, mediante un estimulador Grass SD9. Sólo se utilizaron los tabiques interventriculares que en los momentos iniciales presentaron 10 g o más de tensión desarrollada y tuvieron 10 g o menos de tensión basal, a 28 °C y 0.5 Hz. Se utilizó un flujo constante del líquido de perfusión procurando obtener un flujo medio de 2,15 ml/min y por gramo de tejido.

La composición de los líquidos de perfusión fué, para el caso del Tyrode, (mM): NaCl, 114; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 1,8; NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 0.43; glucosa 5.5 y NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta un pH de 7.4 (aproximadamente 28 mM). En el caso de la solución Hepes (mM): NaCl, 150; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; glucosa 5.5 y Hepes 3. Se ajustó a un pH de 7.4 mediante la adición del NaOH necesario.

La solución de Tyrode se oxigenó con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, mientras que la de Hepes se oxigenó con O<sub>2</sub> puro. La medida del pH, se realizó con un pH-metro digital Crison, mod. micropH 2001 (sensible a la centésima).

Los tabiques interventriculares se colocaron en una cámara de Lucita termostatzada, al objeto de realizar los experimentos a una temperatura constante de  $32 \pm 0.25$  °C. Las temperaturas de trabajo fueron controladas continuamente mediante un teletermómetro (Panlab, mod. pb 0331) y una aguja thermistor (ISY, 524) introducida en la masa muscular. La temperatura de la cámara se controló mediante una sonda de temperatura (YSI, 401) y un teletermómetro digital Cibertec, mod.TT1.

El líquido de perfusión se calentó a su paso por el sistema de perfusión mediante una resistencia de calentamiento acoplada a una fuente de corriente continua de voltaje regulable. El interior de la cámara de Lucita

se mantuvo a la temperatura deseada mediante un radiador relleno de agua, calentada a la temperatura que se precise mediante una resistencia eléctrica, a través del cual se burbujeó gas nitrógeno. El vapor se distribuyó homogéneamente por el interior de la cámara con un ventilador eléctrico interno.

Todas las preparaciones fueron estabilizadas durante, al menos, 45 minutos previamente a introducir cualquier variación correspondiente al protocolo experimental.

Al final de cada experimento, el tabique interventricular fue secado ligeramente con papel de filtro, pesado y desecado en estufa hasta peso constante.

Según las condiciones experimentales generales arriba detalladas se procedió a realizar diferentes series de experimentos.



## **I. ESTUDIOS SOBRE CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.**

### **I.1. Experimentos control.**

Consistieron en mantener durante una o dos horas 6 tabiques interventriculares con perfusión de Tyrode en las condiciones fijadas en la estabilización de la preparación, al objeto de poder hacer un estudio de las variaciones espontáneas que se pudieran producir sobre la tensión desarrollada (TD), tensión de reposo (TR), tiempos para el pico de contracción (tPC) y tiempo total de la contracción (ttC), así como sobre la máxima velocidad de contracción (+dT/dt) y máxima velocidad de relajación (-dT/dt). Se tomaron registros durante 1 minuto a la velocidad de 60 mm/sg, cada 60 minutos.

### **I.2. Experimentos con Dimetil-Amiloride (DMA) en Tyrode.**

Siguiendo el procedimiento descrito en el punto anterior, en primer lugar, realizamos curvas dosis-efecto acumulativas en 9 tabiques, utilizando  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M durante 30 minutos y obteniendo registros de rápida velocidad, en condiciones control y al final de cada una de las sucesivas concentraciones.

En segundo lugar, fueron estudiados los efectos de una concentración única de DMA,  $10^{-5}$  M (n=7), administrada durante 30 minutos, valorando los efectos

sobre la contracción cada 5 minutos.

En 3 experimentos se valoró el efecto sobre contractilidad de una dosis única de DMA,  $10^{-4}$  M.

### **I.3. Experimentos con DMA sobre los efectos contráctiles inducidos por el Cloruro amónico.**

Tras la estabilización, se perfundió durante 5 minutos una solución  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM en Tyrode seguido de un lavado de 15 minutos (control). Tras repetirlo tres veces consecutivas, se asoció el DMA [ $10^{-8}$  (n=2),  $10^{-7}$  (n=5),  $10^{-6}$  (n=4) y  $10^{-5}$  M (n=6)] con el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  así como durante los 15 minutos de lavado. Cada preparación (17) sirvió únicamente para un solo punto experimental. Inmediatamente antes y al finalizar el lavado fueron realizados registros a velocidad rápida, tanto en condiciones control como después de terminar de perfundir cada concentración.

### **I.4. Experimentos sobre contractilidad con DMA en Hepes.**

Tras estabilizar 6 preparaciones con solución de Hepes de igual modo y condiciones que en el punto I.2. se realizó una curva dosis/efecto acumulativa en Hepes con  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, perfundiendo durante 30 minutos cada una.

**I.5. Experimentos con el Acido 4-acetamido- 4'-isotiocianato estilbeno- 2-2'-disulfonico (SITS) y del SITS+DMA en Tyrode.**

En primer lugar, se evaluó en 2 preparaciones estabilizadas, el efecto del SITS ( $10^{-4}$  M; 30 min) en perfusión con Tyrode, de acuerdo con la metodología general de los puntos anteriores.

En 3 experimentos aparte se asoció a la solución de SITS  $10^{-4}$  M el DMA,  $10^{-5}$  M, perfundiendo ambos durante 30 minutos.

## II. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

**Obtención y montaje de los músculos papilares del ventrículo derecho del corazón del conejo.**

**Técnica del registro electrofisiológico.**

Para realizar estos experimentos se utilizaron los músculos papilares de algunos animales utilizados en los estudios de contractilidad. Para ello se procedió según lo descrito anteriormente y, cuando se deseaba obtener papilares para este estudio, se mantenía la perfusión durante 5 minutos adicionales previamente al corte de los papilares y al montaje del tabique. En algunos experimentos control se utilizaron papilares de animales muertos por golpe en la nuca como músculos de referencia.

Uno de los músculos papilares extraídos, se colocaba en una cámara termostatzada y se fijaba sobre su superficie de cera-parafina. Las preparaciones se perfundieron en superficie de forma continua, con la misma solución de Tyrode cuya composición hemos descrito. La solución se mantuvo oxigenada con carbógeno, siendo la temperatura de trabajo de  $32^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Los papilares se estimularon mediante electrodos bipolares de platino con estímulos eléctricos de pulsos rectangulares de 1 msg de duración y frecuencia

de 1 Hz y con un voltaje 20% superior al umbral (GRASS SD9). Los músculos se mantuvieron bajo estimulación durante al menos 60 minutos antes de obtener los registros control.

El registro de la actividad bioeléctrica se obtuvo con microelectrodos de vidrio intracelulares a los que previamente se había rellenado con una solución de KCl 3 M. Se desecharon aquellos cuya resistencia de punta fue inferior a 15 MOhm. La señal se conectó a amplificadores WPI (modelo 701) de alta impedancia de entrada y con una neutralización de capacitancia variable. La señal de salida de éstos se conectó a un osciloscopio digital Tektronix 7854, conectado a un microprocesador Tektronix 4081, acoplado a un sistema de registro Tektronix 4907 donde se almacenó la información en disco flexible. Esta se procesó de acuerdo con la sistemática ya publicada (Díez y cols., 1984).

Los potenciales de acción (PA) se graficaron con un la ayuda de un plotter X-Y (Tektronix 4662).

Los parámetros electrofisiológicos estudiados fueron:

- El potencial de reposo, obtenido como diferencia entre el potencial 0 y el intracelular antes de su estimulación eléctrica, expresado en mV.
- La amplitud del potencial de acción, obtenido como diferencia entre el potencial de reposo y el máximo

voltaje alcanzado en el desarrollo del PA, expresado en mV.

- La velocidad máxima de despolarización ( $dV/dt_{\max}$  o  $V_{\max}$ ) durante la fase 0 del PA, obtenida automáticamente mediante derivación electrónica de la señal en el osciloscopio digital y expresada en V/seg.

- La duración del potencial de acción, medido como el tiempo transcurrido entre la fase 0 del PA y el tiempo en el que se alcanza el 50 % de la repolarización (DPA 50) o el 90% de la repolarización (DPA 90).

Según lo anteriormente expuesto se procedió al estudio de los efectos electrofisiológicos desarrollados por el DMA, de acuerdo con los siguientes protocolos experimentales:

### **II.1. Experimentos con DMA sobre los PA rápidos.**

Tras la estabilización del papilar según lo ya indicado se procedió al registro de PA control y se perfundió DMA,  $10^{-7}$  (n=4),  $10^{-6}$  (n=6) y  $10^{-5}$  M (n=9) durante 30 minutos, realizándose registros de PA cada 10 minutos.

## **II.2. Experimentos con DMA sobre los PA lentos.**

Para evaluar los efectos del DMA,  $10^{-5}$  M (n=2), sobre los PA lentos (calcio- dependientes), éstos se indujeron en Tyrode hiperpotásico (27 mM) tras la adición de adrenalina ( $10^{-6}$  M) y con estimulación eléctrica a 0,2 Hz. Se siguió una metodología de estudio similar a la descrita en el apartado anterior.

## **II.3. Experimentos con DMA sobre las alteraciones electrofisiológicas inducidas por la carga ácida.**

Tras el registro de los PA control, se perfundieron los músculos papilares (n=3) durante 15 minutos con Tyrode conteniendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) y se tomaron frecuentes registros del PA. Tras 20 minutos de lavado se reperfundieron con Tyrode conteniendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  más DMA,  $10^{-5}$  M, durante otros 15 minutos, manteniéndose el DMA durante los 40 minutos del lavado.

### III. ESTUDIO SOBRE PARAMETROS DE CONTRACTILIDAD EN MIOCARDIO ISQUEMICO.

#### III.1. Isquemia global. Técnica general y descripción del modelo.

##### Experimentos control.

Tras estabilizar las preparaciones (7) durante 45 minutos con Tyrode como solución nutritiva, se procedió según la técnica de isquemia global descrita para esta preparación por Bourdillon y Poole-Wilson (1982). En condiciones control, y tras 30 min. de perfusión, se procedió a parar el flujo durante 1 hora, tiempo a partir del cual se reperfundió la preparación durante otros 30 minutos. Durante todo este tiempo se registró continuamente la actividad mecánica desarrollada con una velocidad de registro de 3 mm/min.

Se controló la temperatura de los tabiques durante el tiempo de isquemia, manteniéndose ésta estable a  $32 \pm 0.25$  °C mediante el sistema termostatzado de calentamiento de la cámara.

Los parámetros mecánicos analizados para cuantificar el daño isquémico fueron el máximo cambio en la tensión de reposo y el porcentaje de recuperación tras 30 minutos de reperfundición, medido frente a los valores



inmediatamente anteriores a la isquemia. Al final se secaron los tabiques de acuerdo con lo expuesto anteriormente.

### **III.2. Experimentos con DMA en miocardio isquémico.**

De acuerdo con la metodología expuesta en el punto anterior, se utilizaron soluciones de Tyrode conteniendo  $10^{-7}$  (n=3),  $10^{-6}$  (n=5) y  $10^{-5}$  M (n=6) perfundidas durante 30 minutos de la preisquemia y en la perfusión.

En 6 experimentos se perfundió el DMA,  $10^{-5}$  M, únicamente en los 30 minutos de perfusión tras la isquemia.

### **III.3. Experimentos con EIPA y DEA a dosis equipotentes a DMA.**

De acuerdo con la técnica explicada anteriormente se realizaron experimentos con soluciones de Tyrode conteniendo EIPA  $10^{-6}$  M (n=4) y DEA  $2 \times 10^{-6}$  M (n=4) perfundidos durante los 30 minutos previos a la isquemia y durante la perfusión.

### **III.4. Experimentos con SITS y con SITS + DMA en la isquemia miocárdica.**

Siguiendo la metodología anterior, se valoró el efecto del SITS,  $10^{-4}$  M (n=2), perfundido en la

preisquemia y en el momento de la reperfusión sobre el miocardio isquémico.

En otros 3 experimentos se valoró el efecto conjunto del SITS más DMA,  $10^{-5}$  M, en las mismas condiciones experimentales.

### **III.5. Isquemia de bajo flujo.**

De acuerdo a lo expuesto en el apartado anterior, en lugar de parar totalmente el flujo, éste se mantuvo en valores insuficientes para el correcto funcionamiento cardiaco (0.2 ml/g.min.) durante 1 hora siendo iguales los parámetros a analizar. Se realizaron experimentos control con solución Tyrode (n=4) y experimentos en los que se administró DMA  $10^{-5}$  M durante la perfusión a bajo flujo (n=3).

#### IV. EXPERIMENTOS SOBRE MOVIMIENTOS CON RADIOCALCIO.

##### IV.1. Experimentos con DMA sobre movimientos de $^{47}\text{Ca}$ en la isquemia miocárdica.

En estos experimentos el tabique interventricular se dispone en íntima aposición (2 mm) a un detector de centelleo sólido (Bicron) compuesto por un cristal detector de NaI(Tl) (5x5 cm), de un fotomultiplicador acoplado a una fuente de alta tensión (1000 V.; Bertram) y de un preamplificador (Bicrom). La señal se introduce y amplifica en un analizador multicanal (Camberra, serie 35) operando en forma MCSR.

Al objeto de evitar el conteo de radiactividad correspondiente al isótopo hijo,  $^{47}\text{Sc}^{+++}$  (foto-pico a 159 KeV), se obtuvo el espectro total de emisión del  $^{47}\text{Ca}$  en el analizador multicanal (modo PHA) y se ajustaron las ganancias de amplificación y las ventanas de lectura de tal forma que sólo se contaran los centelleos correspondientes a energías de emisión comprendidas entre 0.4 a 1.5 MeV. Ello permitió almacenar los conteos de radiactividad (cpm) presente en nuestra preparación en los intervalos de tiempo deseados ( $6 \times 10^7$  usg) y de manera continua.

Tras monitorizar los niveles de fondo radiactivo presente en los primeros 10 min., en los 2

experimentos control se cambió la perfusión a Tyrode conteniendo  $^{47}\text{Ca}$  (0.08 uCi/ml; 2.96 kBq/ml). Tras 40 min de perfusión se paró el flujo durante otros 60 min y se reperfundió también con Tyrode conteniendo radiocalcio. En otros 2 experimentos la perfusión se realizó con Tyrode con radiocalcio conteniendo DMA,  $10^{-5}$  M.

Al objeto de disminuir el fondo radiactivo, se apantalló el cristal detector mediante ladrillos de plomo de bajo fondo radiactivo (5 cm. espesor) procurando que la actividad correspondiente al fondo fuera, al menos, menor que el 5% de la actividad total con la que se trabajaba.

Finalizado cada experimento los datos obtenidos en el analizador multicanal se vertieron automáticamente y se almacenaron en disco flexible en un ordenador Inves PC, 640 X, a través de la salida SRS- 232. Se sustrajo automáticamente la actividad correspondiente al fondo radiactivo y los valores resultantes fueron corregidos para el decaimiento ( $\lambda = 4,7$  días). Los cálculos y los gráficos de valores de actividad frente al tiempo fueron realizados mediante un paquete integrado de programas (Symphony, Lotus Development Corp.).

## V. DETERMINACION ANALITICA DEL CONTENIDO DE CALCIO TOTAL.

### V.1. Técnica y experimentos con DMA e isquemia.

Las determinaciones del calcio se realizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Perkin-Elmer compuesto de un espectrofotómetro modelo 5000 con sistema de atomización de llama, muestreador automático modelo AS 50 y estación de datos 3600.

Todo el material empleado para el tratamiento y recogida de muestras fué de vidrio neutro. Su limpieza se realizó con un buen jabón y agua destilada (operación que se repitió multiples veces). Seguidamente se introdujeron, uno o dos días, en ácido nítrico diluído, para después de vueltos a enjuagar, secarlos en estufa. Este tratamiento se llevó a cabo a fin de eliminar totalmente la posible contaminación (Jennings y cols., 1.964).

Se tomaron muestras de 200 a 500 mg de tejido seco (peso entre los que se encontraban todos los tabiques interventriculares, que habían sido puestos anteriormente en una estufa de desecación a 100 °C, hasta peso constante). Se introdujeron en tubos de vidrio neutro perfectamente limpios de contaminación y se añadió 1 ml de ácido nítrico por muestra; se taparon con parafilm y se

esperó 24 horas. Al cabo de este tiempo, se agitaron las muestras con un bórtext y se añadieron otros 2 ml de ácido nítrico esperando otras 24 horas. A continuación se calentaron en baño de agua a 60 °C durante 1 hora en campana de gases. Se dejaron enfriar y se completaron las muestras con agua destilada hasta 10 ml y homogeneizando con agitación.

Se filtraron a continuación para separar el residuo graso y se recogió en tubos idénticos a los anteriores la solución para su análisis final.

A partir de las soluciones ácidas obtenidas de la solubilización de las muestras, se hicieron tomas de alicuotas que se diluyen a 1/2 con una solución acuosa de lantano (solución acuosa de cloruro de lantano al 0,2% en ácido clorhídrico del 1%) y estas soluciones se aspiraron a la llama. La calibración se realizó frente a una solución patrón de calcio de 2 ug/ml de la misma concentración en ácido nítrico que las muestras, diluida también a 1/2 con la misma solución de lantano.

## **VI. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.**

### **VI.1. Técnica y experimentos con DMA en isquemia.**

Para los estudios de microscopía electrónica se tomaron muestras de miocardio de aproximadamente 1 mm de lado, a las que se fijó por técnicas de inmersión. La toma de muestra se realizó en la porción de la base, tomando como referencia su proximidad a la arteria del tabique interventricular.

El tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su fijación no superó en ningún caso los 30 segundos, utilizándose con este fin el fijador Karnowsky (glutaraldehído 1.25%; paraformaldehído 1% en buffer cacodilato 0.5 M).

Las muestras se mantuvieron en el fijador durante 2 horas y, a continuación, se eliminó el exceso de fijador mediante un lavado de 15 minutos en buffer Sorensen (0.1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.4). Se realizó una postfijación en tetróxido de osmio al 2% en buffer Sorensen durante 2 h. Por último, las piezas se contrastaron durante 30 minutos en acetato de uranilo al 2% en buffer Michaelis (0.025 M, pH 7, 440 mOsm/l, con 2 nmoles de calcio).

Todas las piezas fueron deshidratadas en acetonas de gradaciones crecientes y finalmente en óxido

de propileno, siendo a continuación incluidas en Araldita.

A fin de seleccionar las zonas que iban a ser estudiadas ultramicroscopicamente, todos los bloques fueron previamente seccionados en cortes de 1  $\mu$ m de espesor, mediante un ultra microtomo Ultratome LKB-III, y teñidos con azul de toluidina al 0.5% en borato sódico al 3%.

De las áreas seleccionadas se obtuvieron cortes de 20-40 nm de espesor con un Ultratome LKB-III, recogién dose en rejillas de cobre de 400 mesh filmadas con Formvar y reforzadas con carbón. Estos cortes se contrastaron para la observación electromicroscópica con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones así obtenidas se estudiaron y fotografiaron en un microscopio Hitachi HU-12A con un potencial de aceleración de 75-100 KV. Al menos se estudiaron veinte campos por cada septum analizado.

## VII. ANALISIS ESTADISTICO.

Las diferencias entre medias fueron analizadas mediante el método de la t de Student para datos apareados o no apareados dependiendo del tipo de experimento. Mientras no se indique lo contrario los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media ( $X \pm E.S.M.$ ). Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de  $P < 0.05$ .



**VIII. PRODUCTOS RADIATIVOS, FARMACOS Y OTROS PRODUCTOS.**

**DMA** (Dimetil-amiloride) y **EIPA** (Etil-isopropil- amiloride) fueron una donación de Merck, Sharp & Dohme (USA).

**DEA** (dietil-amiloride) fué sintetizado en el Depart. de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

**SITS** (4 acetamido- 4'isocianato-estilbeno 2,2'-ácido disulfónico), Sigma.

<sup>47</sup>Ca, Asmershan.

**Acido nítrico**, Suprapur<sup>r</sup>, Merck.

Las soluciones de los fármacos fueron obtenidas en agua destilada salvo en el caso de EIPA en las que se añadió la mínima cantidad de dimetil-sulfóxido hasta la disolución. Las diluciones posteriores fueron realizadas directamente en la solución Tyrode o Hepes. Las soluciones de adrenalina fueron estabilizadas con ácido ascórbico al objeto de prevenir la degradación oxidativa. El resto de reactivos empleados fueron al menos de pureza para análisis.

**RESULTADOS**

## **I. RESULTADOS SOBRE CONTRACTILIDAD MIOCARDICA.**

### **I.1. Variaciones en el tiempo de los parámetros de contractilidad en condiciones control.**

La tabla I muestra los máximos porcentajes de variación obtenidos en 6 tabiques a los que se perfundió con Tyrode durante 120 minutos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas frente al control para ninguno de los parámetros estudiados a lo largo de este tiempo.

El máximo porcentaje de variación fué del 5 % tanto para la tensión desarrollada como para la máxima velocidad de relajación, con valores extremos en el rango inferior del 91 y 90 % respectivamente.

### **I.2. Efectos del Dimetil amiloride (DMA) sobre contractilidad.**

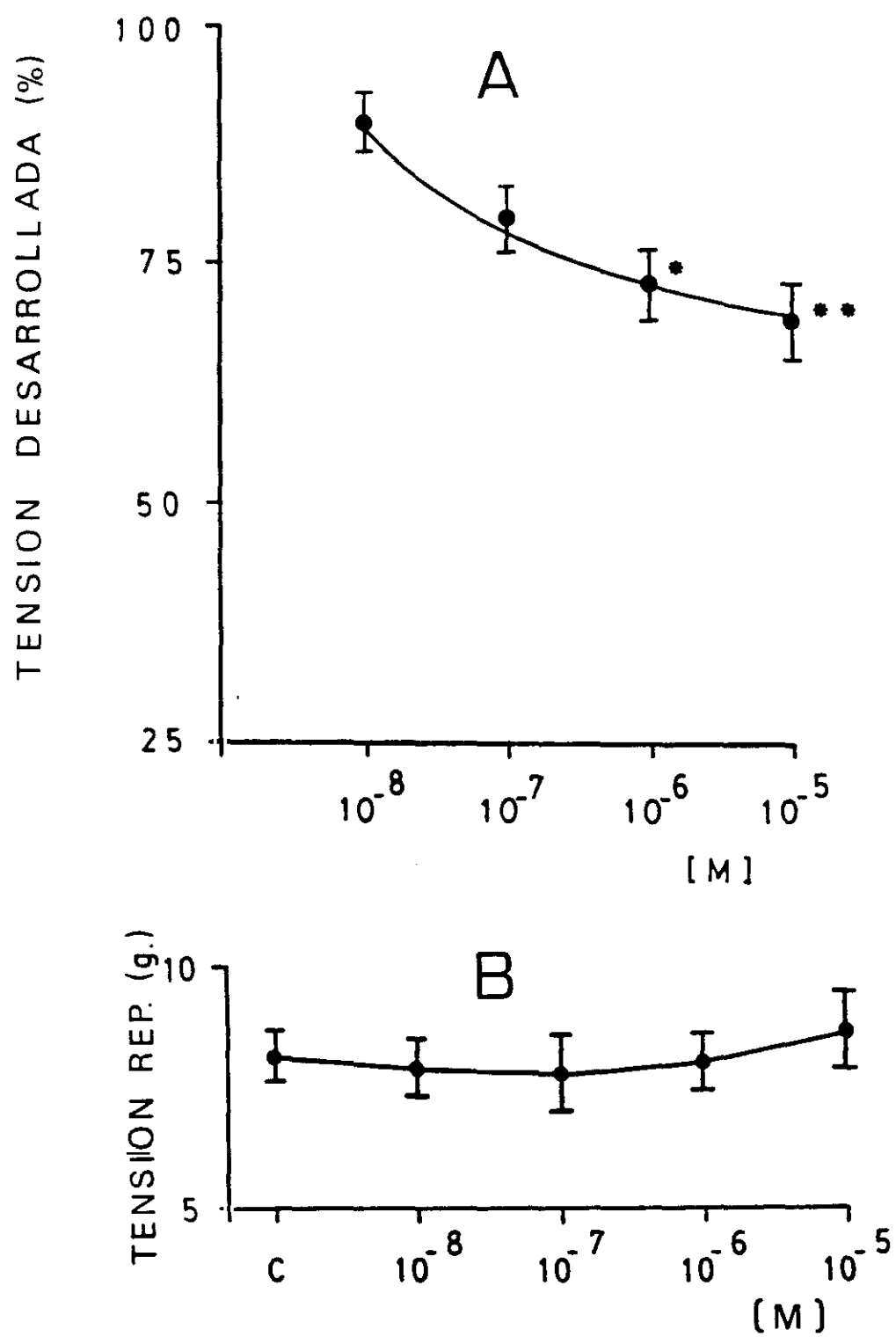
En la figura 10,a se observa el efecto del DMA perfundido durante 30 minutos de forma acumulativa ( $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M). Este produjo una disminución dosis-dependiente de la tensión desarrollada llegando a alcanzar significación estadística a partir de  $10^{-6}$  M.

La máxima disminución de amplitud contráctil fue de  $35.3 \pm 4.5$  % con DMA  $10^{-5}$  M ( $P < 0.05$ ). Por el

contrario, la tensión de reposo no modificó su valor de forma significativa (figura 10,b).

**TABLA I.-** Parámetros de contractilidad control obtenidos en 6 septums interventriculares, aislados y perfundidos arterialmente, del corazón del conejo ( NZW ), tras ser perfundidos con Tyrode durante 60 y 120 min.. TD = tensión desarrollada; TR = Tensión de reposo; tPC = tiempo para el pico de contracción; ttc = tiempo total de la contracción;  $+dT/dt$  = máxima velocidad de contracción;  $-dT/dt$  = máxima velocidad de relajación. Los resultados se encuentran expresados en porcentajes frente a los valores iniciales como  $\bar{x} \pm E.S.M.$  Los valores entre corchetes son los valores extremos.

	TD (%)	TR (%)	tPC (%)	ttc (%)	$+dT/dt$ (%)	$-dT/dt$ (%)
60 min.	99 $\pm$ 1,0 [98-100]	97 $\pm$ 3,5 [93-100]	100 ---	100 ---	100 ---	101 $\pm$ 1,5 [100-103]
120 min.	95 $\pm$ 1,8 [91-97]	101 $\pm$ 4,9 [93-110]	96 $\pm$ 1,9 [93-100]	98 $\pm$ 1,9 [95-101]	97 $\pm$ 2,7 [92-100]	95 $\pm$ 2,9 [90-100]



**Fig.10** Curvas dosis- efecto del N-5,5'-dimetil-amiloride ( DMA ) en dosis acumulativas,  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M, perfundidas durante 30 minutos cada una, en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW), sobre ( **A** ) tensión desarrollada expresada como porcentaje sobre el valor control y ( **B** ) sobre la tensión de reposo. Cada punto es la media de 9 experimentos; las rayas verticales representan el E.S.M.. \* =  $P < 0,05$  \*\* =  $P < 0,01$

En la figura 11,a se pueden apreciar los efectos de estas concentraciones de fármaco sobre la máxima velocidad de contracción y máxima velocidad de relajación. A la máxima concentración estudiada, estos parámetros disminuyeron en un  $30.1 \pm 4.8$  y  $34.5 \pm 4.5$  % ( $P < 0.01$ ) respectivamente, sin existir diferencias estadísticas significativas entre cada uno de ellos. No se modificó de forma significativa el tiempo para el pico de contracción, el tiempo de relajación ( $-4.9 \pm 2.8$  %) o la duración total de la contracción ( $-7.8 \pm 2.2$  %). En cualquier caso, estas variaciones se encuentran en el rango de variabilidad apreciado en los experimentos control (figura 11,b).

En la figura 12 se observa el registro típico de contracción en condiciones control y tras la perfusión con una concentración única de DMA,  $10^{-5}$  M, durante 30 minutos. En estas condiciones, la disminución de la contractilidad se realiza de forma progresiva, llegándose a alcanzar el máximo efecto aproximadamente a los 30 minutos (figura 13).

La perfusión con líquido nutricio sin fármaco durante otros 30 minutos dió lugar a una recuperación de los valores de contractilidad similares a los obtenidos en condiciones control, antes del fármaco.



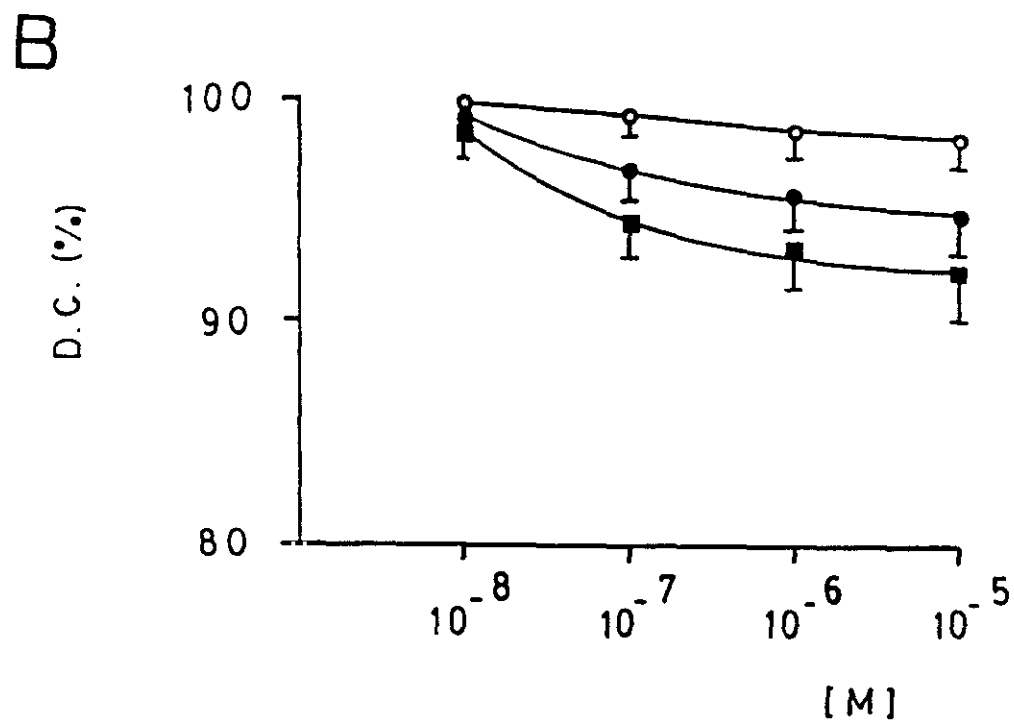
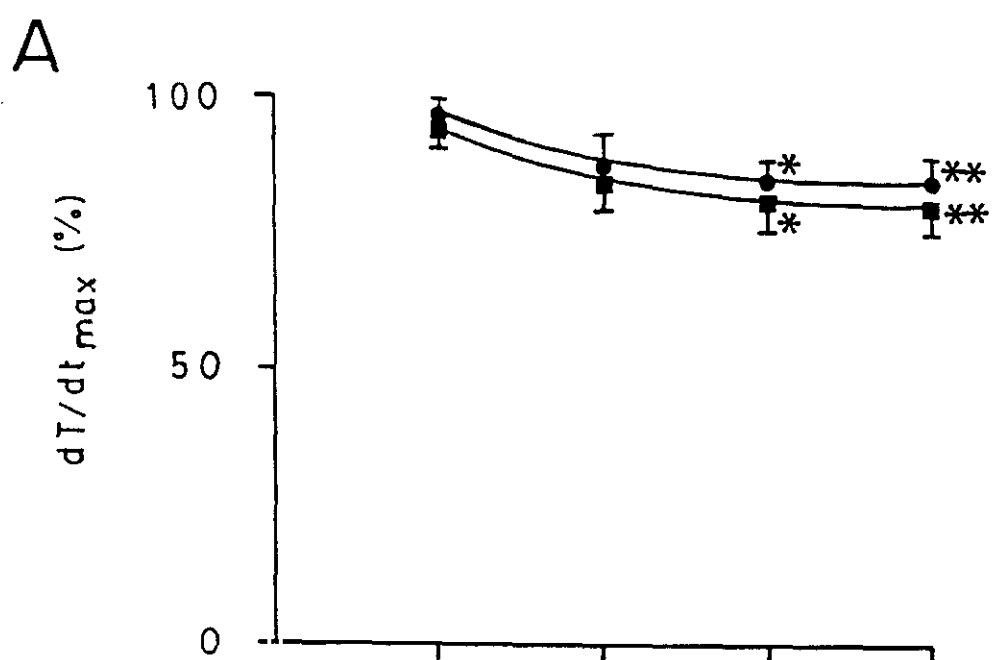
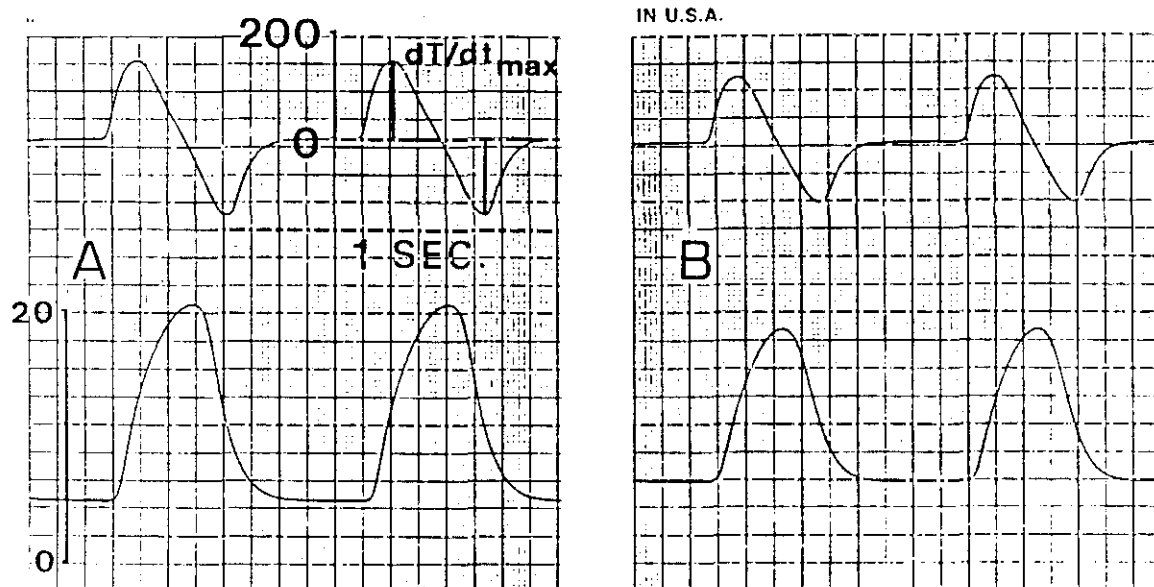
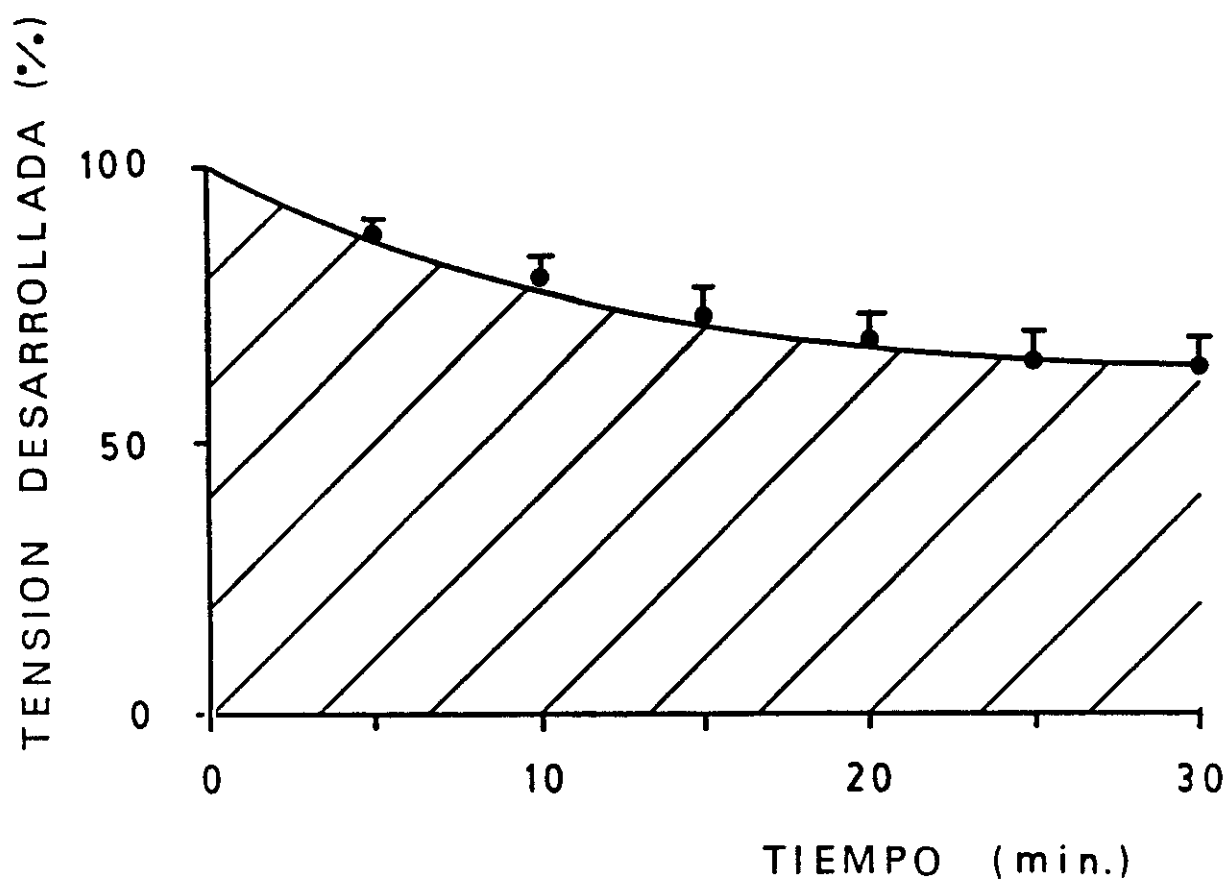


Fig.11 Curvas dosis- efecto del DMA en dosis acumulativas,  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M, perfundidas durante 30 minutos cada una, en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW), sobre ( A ) máxima velocidad de contracción (● ,  $+dT/dt$  ) y de relajación (■ ,  $-dT/dt$  ), expresadas como porcentaje sobre sus valores control y ( B ) sobre el tiempo para el pico de contracción (○), tiempo de relajación (●) y tiempo total de contracción (■). Cada punto es la media de 9 experimentos; las rayas verticales representan el E.S.M.



**Fig.12** Registro típico de la tensión desarrollada ( trazo inferior ) y su primera derivada ( trazo superior ), obtenido a velocidad rápida ( 6 cm/sec ), en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW) en condiciones control ( panel A ) y tras el efecto de DMA,  $10^{-5}$  M, perfundido durante 30 min. ( panel B ). Calibración horizontal: tiempo ( 1 sec ). Vertical arriba: velocidad de contracción (  $\pm dT/dt$ ; g/sec ). Vertical abajo: tensión ( g ).



**Fig.13** Efecto en el tiempo del DMA,  $10^{-5}$  M, sobre la contracción obtenida en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón del conejo (NZW). Ordenadas: % de tensión desarrollada sobre valores control inmediatamente antes de perfundir fármaco. Abscisas: tiempo ( min ). Cada punto es la media de 7 experimentos; las rayas verticales indican el E.S.M.. Estos valores fueron calculados a partir de los registros obtenidos en los experimentos de isquemia ( Tabla V ).

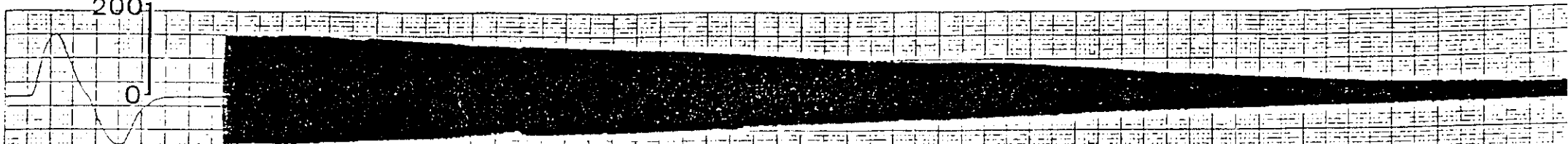
La figura 14 muestra un registro típico de los efectos obtenidos con dosis únicas de DMA a la concentración de  $10^{-4}$  en 3 tabiques. Se pone de manifiesto que el efecto inotrope negativo es mucho más intenso con esta concentración, llegando casi hasta la anulación de la misma a los 20 minutos, si bien se aprecia que existen alteraciones de excitabilidad. En los 3 tabiques existieron pérdidas progresivas de la conducción de los estímulos eléctricos. Además, según se muestra en la figura 15, la recuperación de contractilidad tras 60 minutos de perfusión sin fármaco fue incompleta, alcanzándose menos del 50 % frente a los valores control en los 3 tabiques estudiados.

### **I.3. Efectos del DMA sobre las modificaciones de los parámetros de contractilidad inducidas por la carga ácida.**

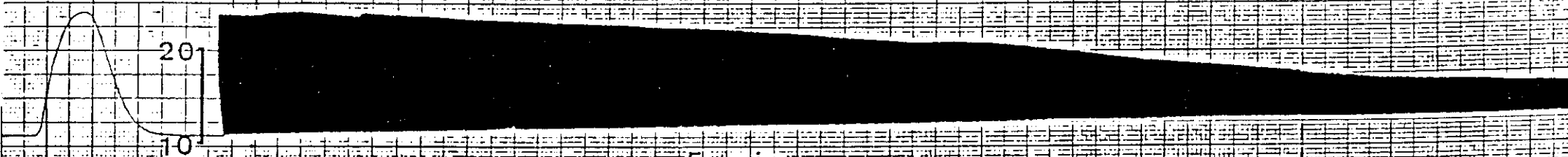
La figura 16 muestra un registro típico del efecto del DMA  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M sobre la contractilidad del tabique, tras el cese de la reperfusión con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  10 mM administrado durante 5 minutos.

En condiciones control, esta carga ácida produjo un efecto inotrope negativo transitorio, ( $n=17$ ;  $-48 \pm 3.05$  %). El pretratamiento con DMA  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M, durante la perfusión con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  y durante el lavado, produjo un potenciamiento dosis-dependiente del efecto inotrope negativo inducido por la carga ácida,

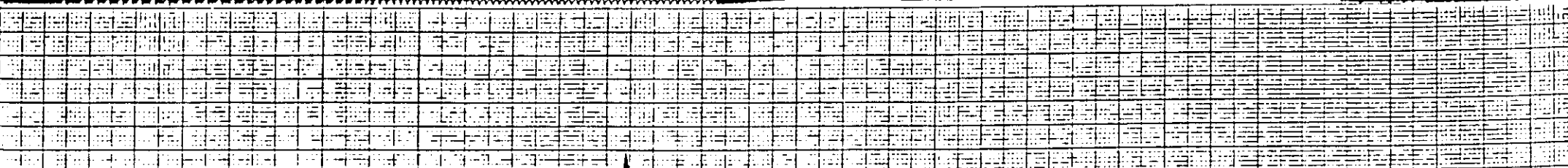
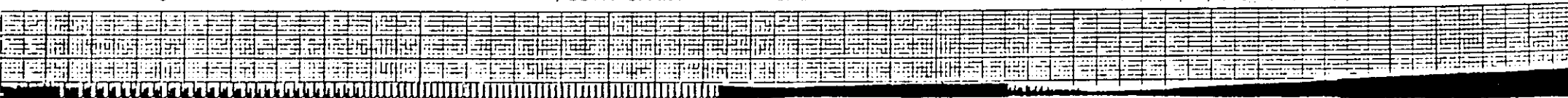
así como un alargamiento del tiempo necesario para alcanzar el nadir.



DMA  $10^{-4}$  M



5 min

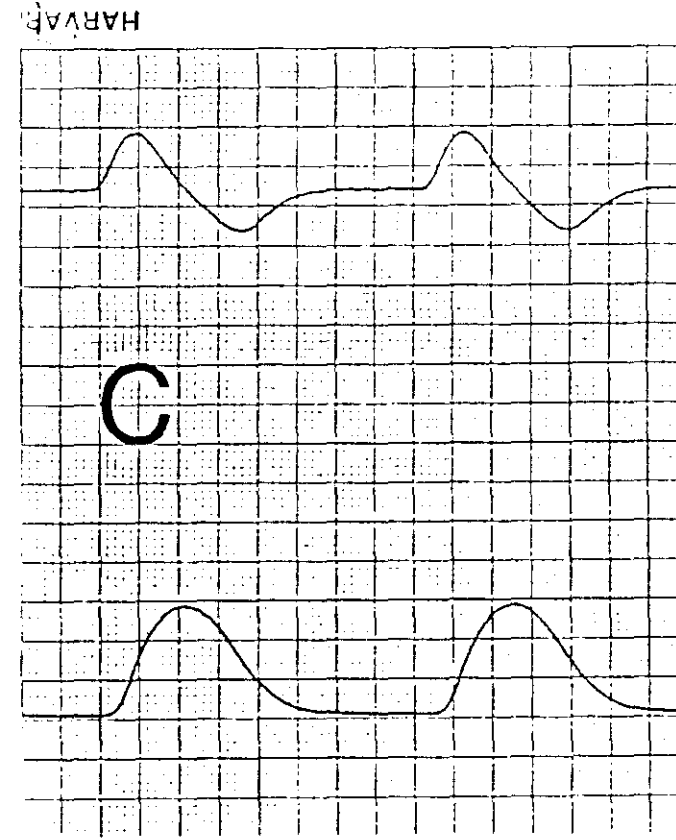
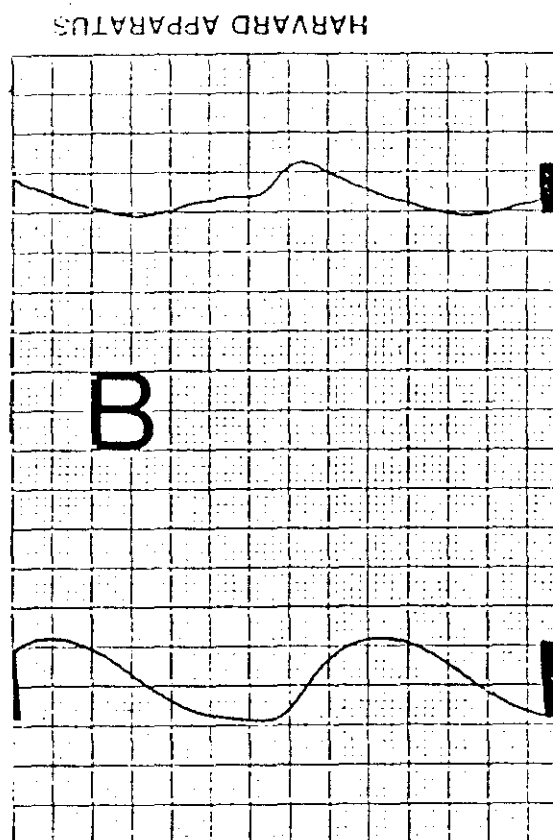
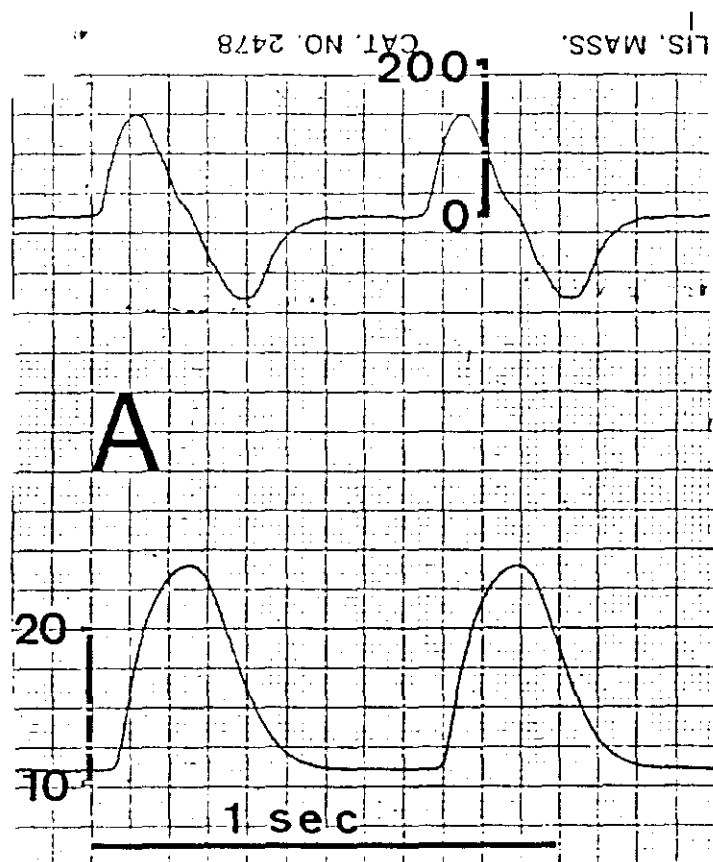


1 min

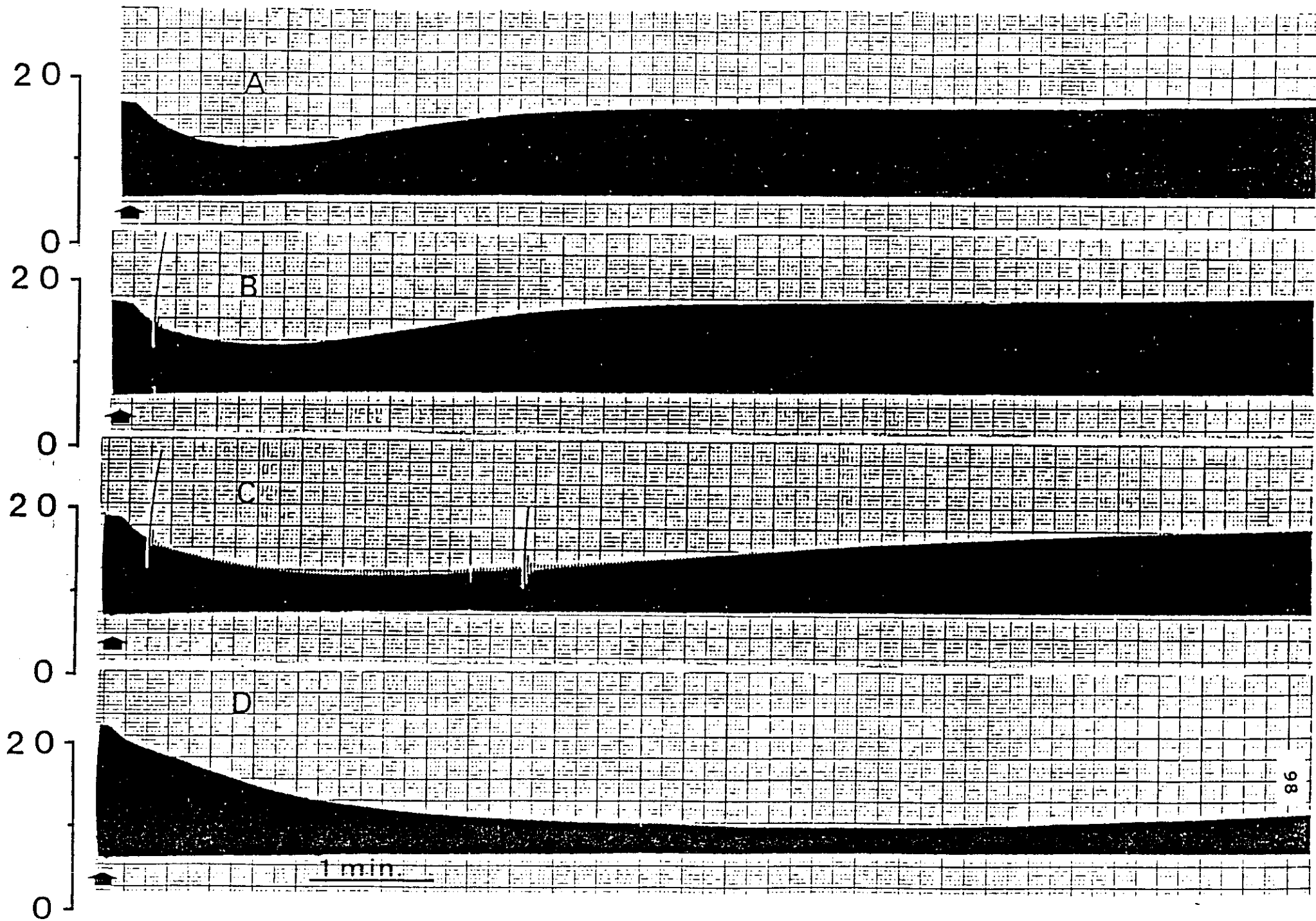
5 min

**Fig.14** Registro típico del efecto del DMA,  $10^{-4}$  M sobre la tensión desarrollada ( trazo inferior ) y su primera derivada ( trazo superior ), en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo. Los trazos inferiores son continuación de los superiores. Los números 1:n representan la pérdida de contracción por cada n estímulos eléctricos. Calibración horizontal: tiempo ( 1 - 5 min ). Vertical arriba: velocidad de contracción (  $\bar{d}T/dt$ ; g/sec ). Vertical abajo: tensión ( g ).





**Fig.15** Registro típico a velocidad rápida ( 6 cm/sec ) para apreciar el efecto del DMA,  $10^{-4}$  M sobre la tensión desarrollada ( trazo inferior ) y su primera derivada ( trazo superior ), en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo, en condiciones control ( panel A ), tras 15 minutos de perfusión con fármaco ( panel B ) y la recuperación tras otros 25 minutos con fármaco y 60 minutos con tyrode sin él ( panel C ). Calibración horizontal: tiempo ( 1 sec ). Vertical arriba: velocidad de contracción (  $\frac{dT}{dt}$ ; g/sec ). Vertical abajo: tensión ( g ).

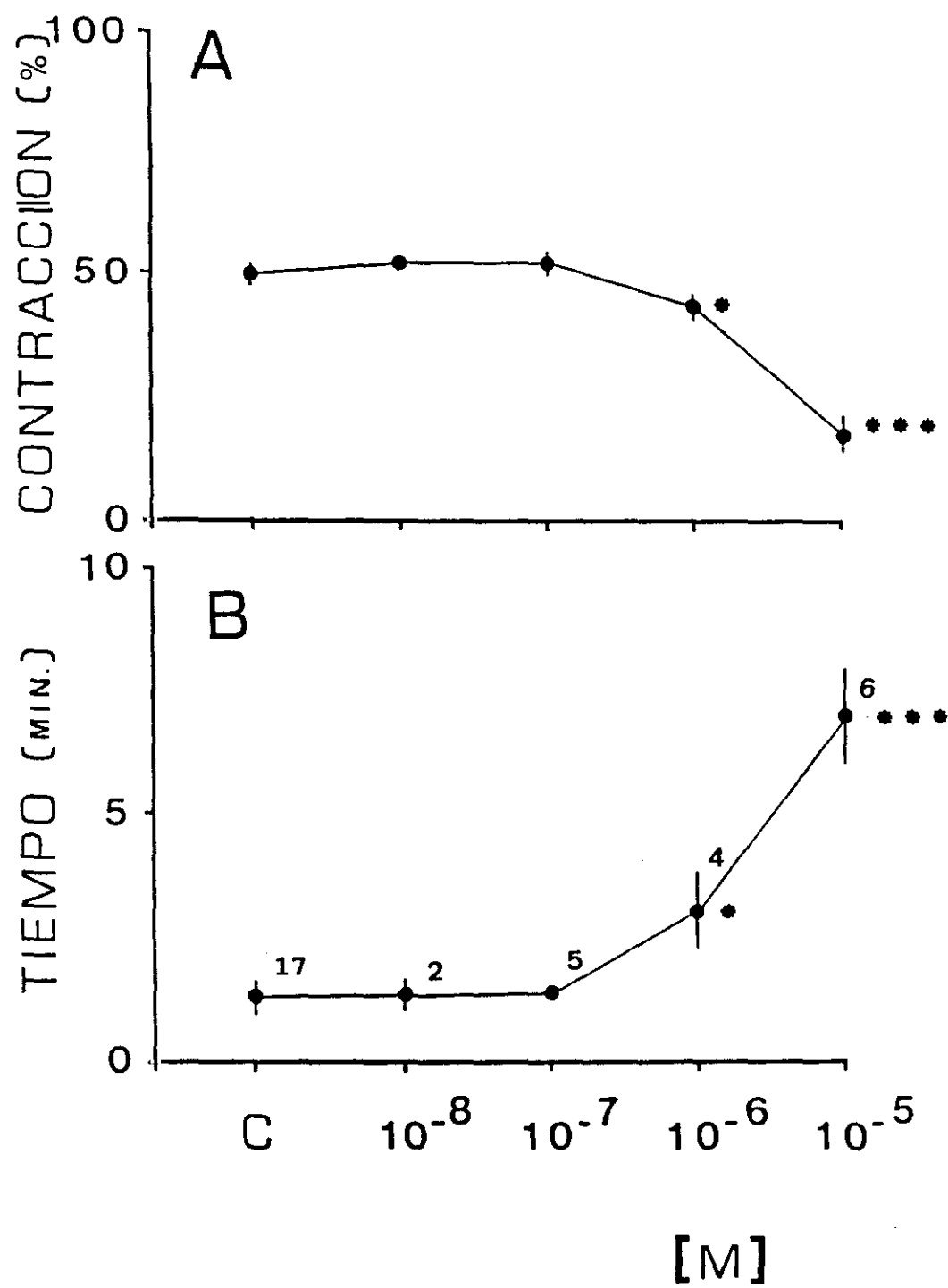


**Fig.16** Registro típico del efecto de la acidificación del citoplasma inducida por la supresión de la perfusión con cloruro amónico (▲; 10mM, 5 min ) sobre la contractilidad del septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW), en condiciones control ( **A** ) o bajo el tratamiento con DMA,  $10^{-7}$  M ( **B** ),  $10^{-6}$  M ( **C** ) y  $10^{-5}$  M ( **D** ). Los registros A, B y C corresponden a un mismo experimento. Calibración horizontal: tiempo ( 1 min ). Vertical: tensión ( g ).

La figura 17 muestra una representación de estos efectos. En ella se aprecia que existieron diferencias estadísticamente significativas frente a los valores controles para la mínima contractilidad inducida por la carga ácida y para su nadir ( $-48.9 \pm 3.05 \%$  vs  $-83.3 \pm 18.1 \%$  para contractilidad y  $1.27 \pm 0.07$  vs  $7.03 \pm 1.02$  minutos para el nadir; control vs DMA  $10^{-5}$ ;  $P < 0.001$ ).

#### **I.4. Efectos sobre contractilidad del DMA utilizando HEPES como líquido nutricional.**

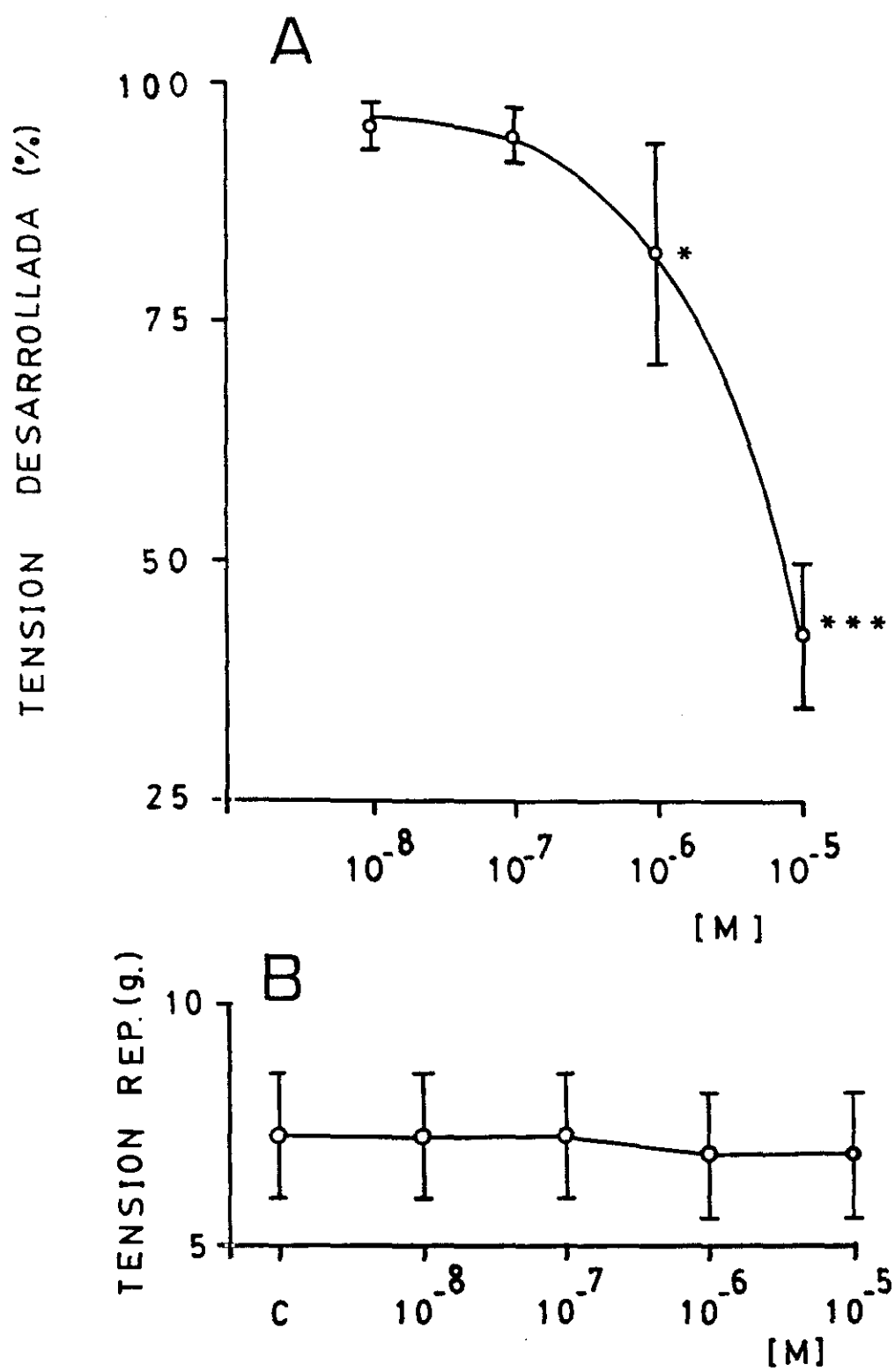
Los efectos contráctiles del DMA sobre tabiques perfundidos con solución nutritiva HEPES (pH 7.4), aparecen recogidos en las figuras 18 y 19. El DMA  $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M administrado durante 30 minutos produjo un efecto inotrope negativo dosis-dependiente, siendo estadísticamente significativo a partir de  $10^{-6}$  M (figura 18,a). A la concentración de  $10^{-5}$  M se obtiene un efecto inhibidor de la contractilidad 2 veces mayor que el obtenido utilizando Tyrode como solución nutritiva. La tensión de reposo, por el contrario, no se modificó significativamente a ninguna de las concentraciones estudiadas. Al igual de lo ocurrido con los experimentos en los que se empleó solución nutritiva



**Fig.17** Efectos del DMA,  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M, sobre la inotropia negativa inducida por la acidificación del mioplasma obtenida mediante la supresión de la perfusión con cloruro amónico ( 10 mM, 5 min ), en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW).

**A:** Mínima tensión desarrollada, expresada como porcentaje sobre el valor inmediatamente anterior al cese de la perfusión con cloruro amónico.

**B:** Tiempo hasta la mínima tensión desarrollada. Los números incluidos en la gráfica indican el número de experimentos realizados para cada dosis; las rayas verticales representan el E.S.M.. \* =  $P < 0,05$  \*\*\* =  $P < 0,001$



**Fig.18** Curvas dosis-efecto del DMA, en dosis acumulativas (  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M ), perfundidas en solución HEPES durante 30 minutos cada una, en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW), sobre:

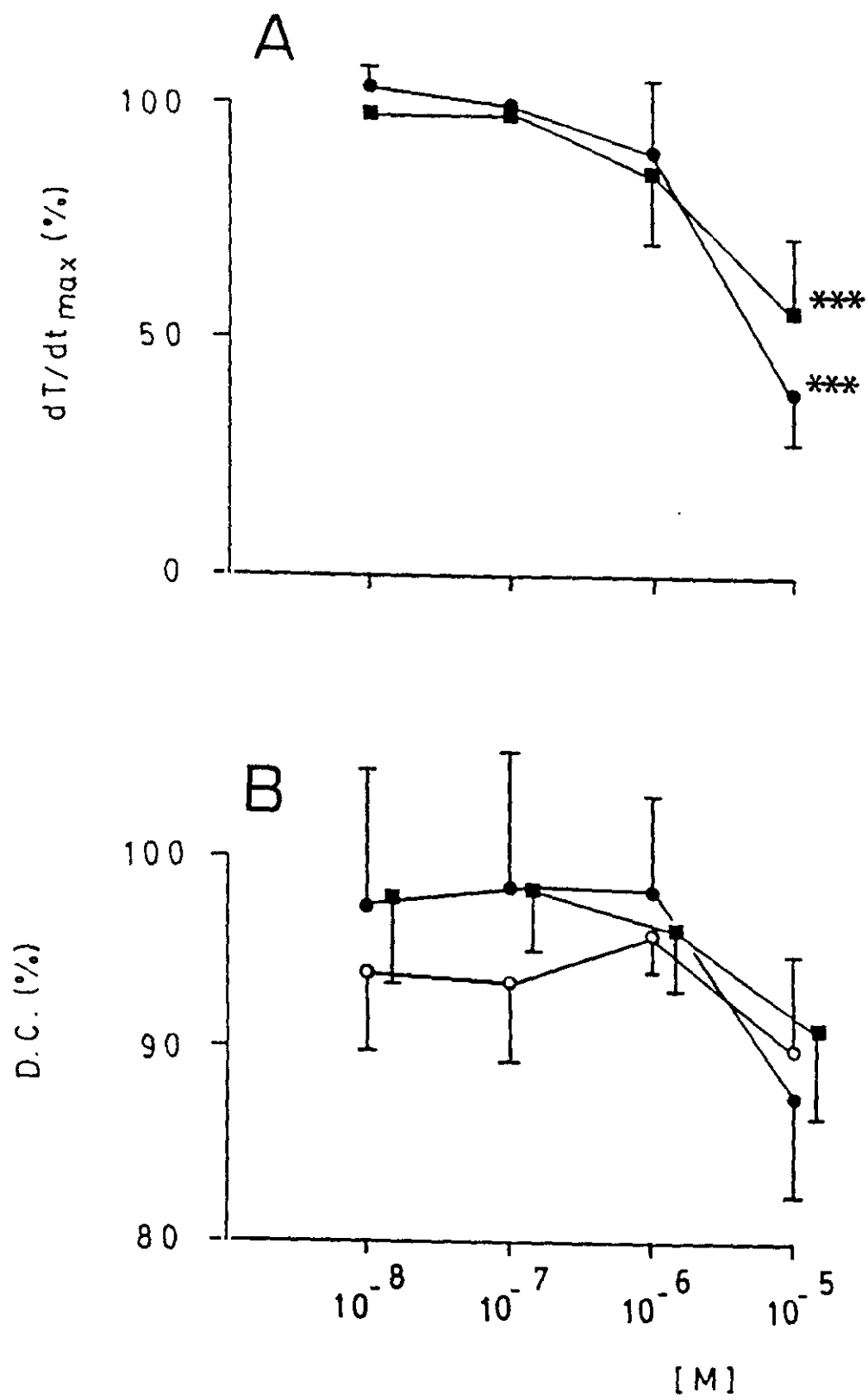
**A:** Tensión desarrollada expresada como porcentaje sobre el valor control.

**B:** Sobre la tensión de reposo. Cada punto es la media de 6 experimentos; las rayas verticales representan S.D.      \* =  $P < 0,05$  \*\*\* =  $P < 0,001$



Tyrode, existió una disminución proporcional en la máxima velocidad de contracción y en la máxima velocidad de relajación, estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) a la dosis de  $10^{-5}$  M (figura 19,a).

Los efectos del DMA en HEPES, al igual que con Tyrode, no modificaron de forma significativa el tiempo para el pico de la contracción, el tiempo de relajación o el tiempo total de contracción (figura 19,b).



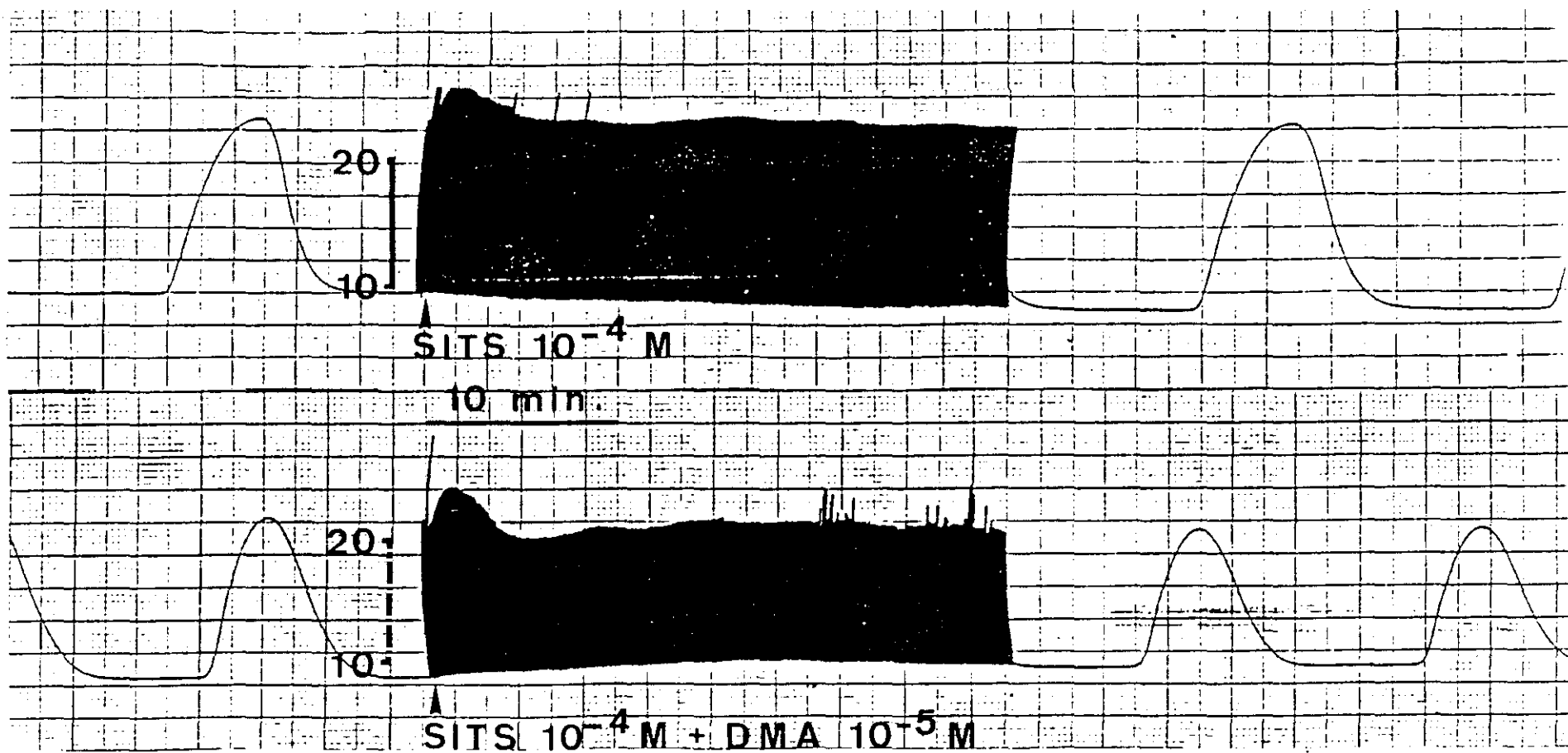
**Fig.19** Curvas dosis- efecto del DMA en dosis acumulativas,  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M, perfundidas en solución HEPES durante 30 minutos cada una, en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW), sobre:

**A:** Máxima velocidad de contracción (● ,  $+dT/dt$  ) y de relajación (■ ,  $-dT/dt$  ), expresadas como porcentaje sobre sus valores control.

**B:** Sobre el tiempo para el pico de contracción (○), tiempo de relajación (●) y tiempo total de contracción (■). Cada punto es la media de 4 experimentos; las rayas verticales representan el E.S.M.

### **I.5. Efectos del SITS y DMA + SITS sobre contractilidad.**

En la figura 20 pueden apreciarse los efectos típicos del SITS y del DMA asociado al SITS sobre la contractilidad del tabique interventricular. La perfusión con SITS en 2 tabiques como fármaco único a la concentración de  $10^{-4}$  M no indujo variaciones apreciables sobre los parámetros contráctiles a estudio. En otros 2 tabiques, El DMA  $10^{-5}$  M, asociado al SITS  $10^{-4}$  M, produjo efectos sobre contractilidad superponibles a los obtenidos en ausencia de éste.



**Fig.20** Registro típico del efecto del SITS,  $10^{-4}$  M ( trazo superior ) y del efecto del DMA,  $10^{-5}$  M, en presencia del SITS,  $10^{-4}$  M, ( trazo inferior ) sobre la tensión desarrollada en el septum interventricular aislado y perfundido arterialmente del corazón de conejo (NZW). Calibración horizontal: tiempo ( 10 min ). Vertical: tensión desarrollada ( g ).

## II. EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

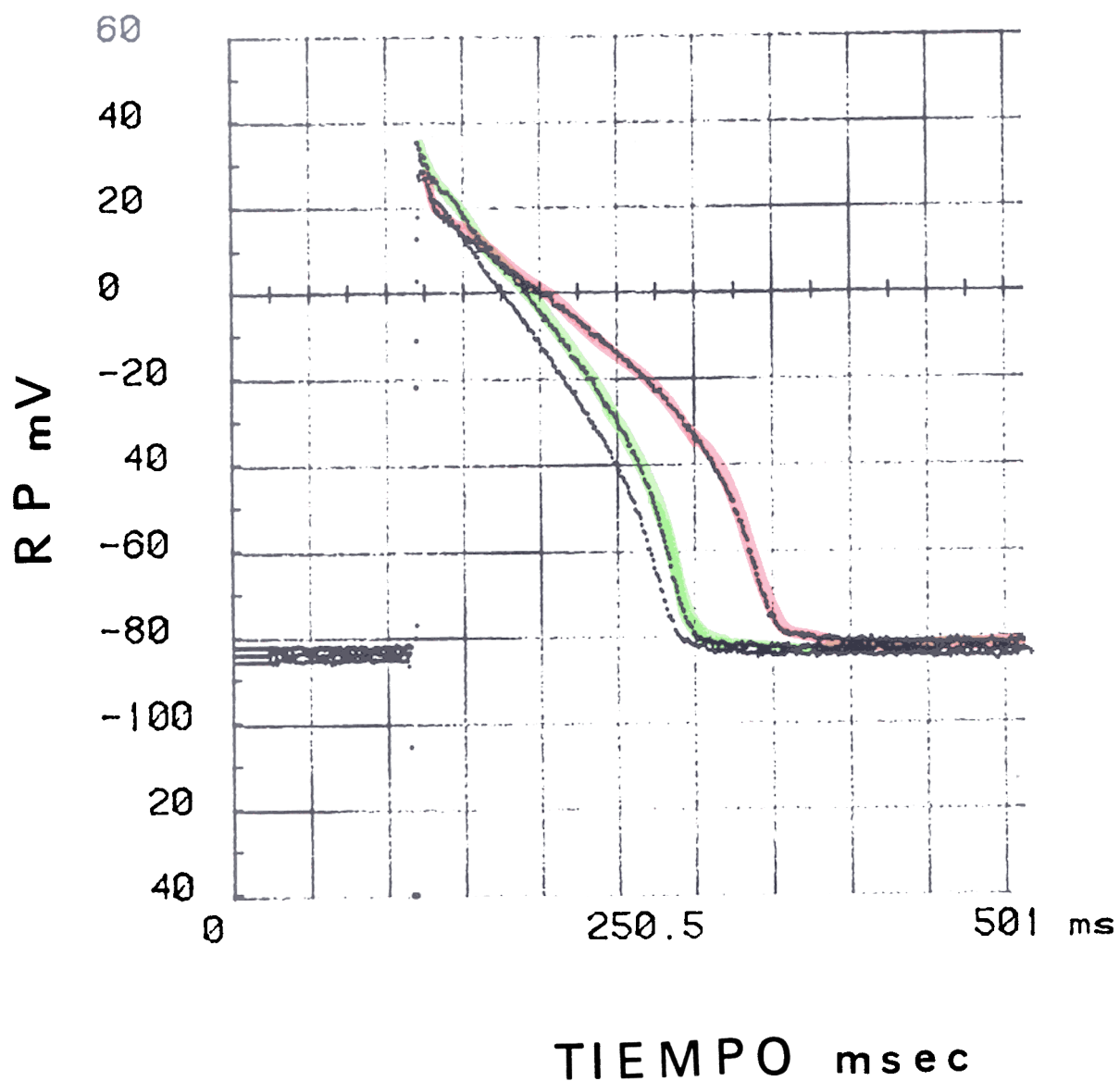
### II.1. Efectos electrofisiológicos del DMA sobre los potenciales de acción rápidos.

Los efectos electrofisiológicos del DMA  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M, perfundido durante 30 minutos, estudiados sobre el potencial de acción (PA) rápido en el músculo papilar de conejo se muestran en la figura 21.

DMA,  $10^{-7}$  M, no produjo variaciones estadísticamente significativas (tabla II). Por el contrario, el DMA  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M, tras 30 minutos de perfusión, produjo un aumento dosis-dependiente de la duración del potencial de acción, tanto al 50 % como al 90 % de la repolarización. Ninguno del resto de parámetros analizados fue modificado significativamente.

DMA,  $10^{-5}$  M, produjo diferencias estadísticamente significativas ya a partir de los 10 minutos (tablas III y IV).

Un registro típico del efecto en el tiempo del DMA  $10^{-5}$  M sobre el potencial de acción se observa en la figura 22.



**Fig.21** Registro típico de potenciales de acción de músculos papilares aislados, obtenidos del ventrículo derecho del corazón de conejo (NZW) y estimulados a 1 Hz, en condiciones control ( trazo negro ), o tras la perfusión durante 30 minutos con DMA,  $10^{-6}$  M ( trazo verde ) o  $10^{-5}$  M ( trazo rojo ). Ordenadas: potencial de reposo ( mV ). Abscisas: tiempo ( msec ).



**TABLA II.-** Efectos en el tiempo del DMA,  $10^{-7}$  M, sobre los parámetros electrofisiológicos obtenidos en músculos papilares aislados de corazón del conejo ( NZW ). Ampl. = amplitud; RP = potencial de reposo;  $V_{\max}$  = máxima velocidad de despolarización; DPA<sub>50</sub> = duración del potencial de acción al 50 % de la repolarización; DPA<sub>90</sub> = duración del potencial de acción al 90 % de la repolarización. Los números entre paréntesis indican el número de análisis obtenidos en músculos papilares de diferentes animales. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm \text{E.S.M.}$

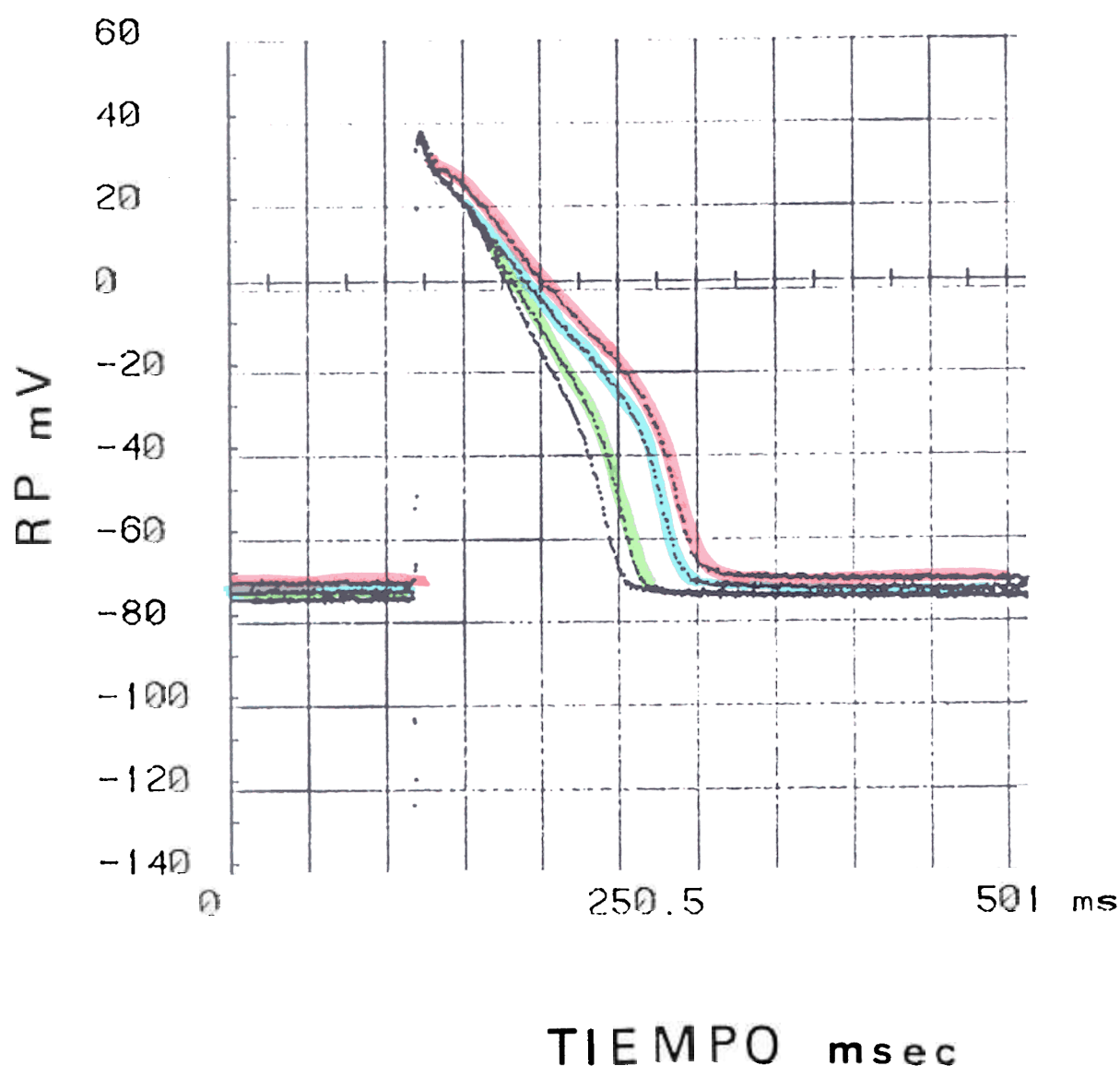
	Ampl. (mV)	RP (mV)	$V_{\max}$ (V/sec)	DPA <sub>50</sub> (msec)	DPA <sub>90</sub> (msec)
control	121±13,8 ( 4 )	85±2,26 ( 4 )	190±28,3 ( 2 )	122±13,8 ( 4 )	207±54,0 ( 4 )
10 min.	125±29,5	86±2,77	183±12,7	123±11,2	194±37,8
20 min.	120±10,8	85±2,41	156±41,3	123±10,3	195±34,2
30 min.	128±24,3	84±2,42	196±17,7	122± 9,3	187±24,0

**TABLA III.-** Efectos en el tiempo del DMA,  $10^{-6}$  M, sobre los parámetros electrofisiológicos obtenidos en músculos papilares aislados de corazón del conejo ( NZW ). Ampl. = amplitud; RP = potencial de reposo;  $V_{\max}$  = máxima velocidad de despolarización; DPA<sub>50</sub> = duración del potencial de acción al 50 % de la repolarización; DPA<sub>90</sub> = duración del potencial de acción al 90 % de la repolarización. Los números entre paréntesis indican el número de análisis obtenidos en músculos papilares de diferentes animales. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm$  E.S.M.

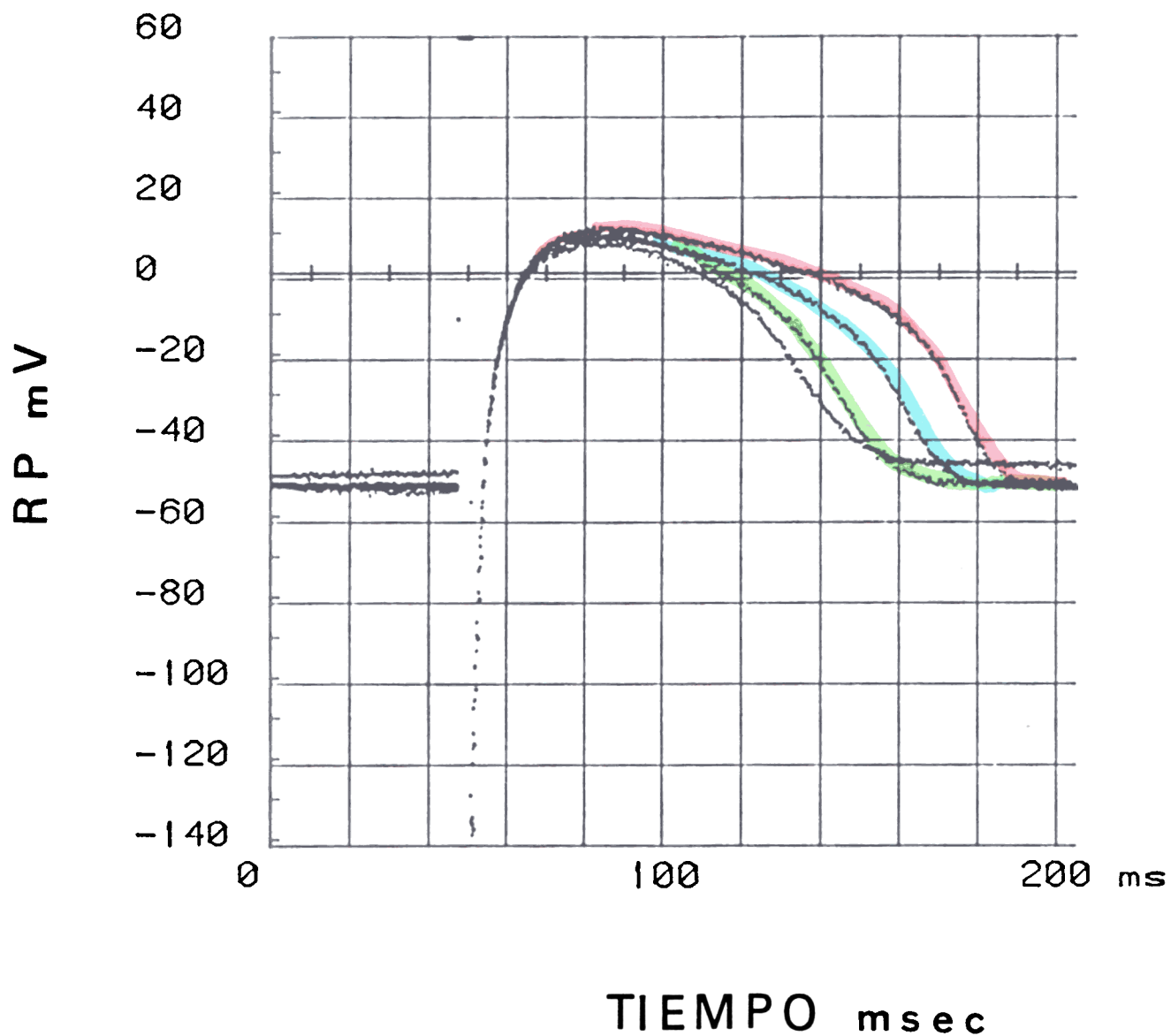
	Ampl. (mV)	RP (mV)	$V_{\max}$ (V/sec)	DPA <sub>50</sub> (msec)	DPA <sub>90</sub> (msec)
control	113 $\pm$ 10,4 ( 6 )	85 $\pm$ 2,75 ( 6 )	123 $\pm$ 58,3 ( 3 )	115 $\pm$ 18,7 ( 6 )	187 $\pm$ 34,6 ( 6 )
10 min.	115 $\pm$ 9,3	85 $\pm$ 2,71	157 $\pm$ 67,7	119 $\pm$ 20,7	195 $\pm$ 37,7
20 min.	115 $\pm$ 9,5	86 $\pm$ 3,81	165 $\pm$ 98,3	122 $\pm$ 21,9	194 $\pm$ 41,1
30 min.	115 $\pm$ 10,0	86 $\pm$ 3,77	143 $\pm$ 59,2	123 $\pm$ 20,4	195 $\pm$ 41,9

**TABLA IV.-** Efectos en el tiempo del DMA,  $10^{-5}$  M, sobre los parámetros electrofisiológicos obtenidos en músculos papilares aislados de corazón del conejo ( NZW ). Ampl. = amplitud; RP = potencial de reposo;  $V_{\max}$  = máxima velocidad de despolarización; DPA<sub>50</sub> = duración del potencial de acción al 50 % de la repolarización; DPA<sub>90</sub> = duración del potencial de acción al 90 % de la repolarización. Los números entre paréntesis indican el número de análisis obtenidos en músculos papilares de diferentes animales. Los resultados se expresan como  $X \pm S.D.$  ;  $*=p<0.05$  al menos para datos apareados.

	Ampl. (mV)	RP (mV)	$V_{\max}$ (V/sec)	DPA <sub>50</sub> (msec)	DPA <sub>90</sub> (msec)
control	110 $\pm$ 9,0 ( 9 )	83 $\pm$ 5,06 ( 9 )	131 $\pm$ 49,1 ( 4 )	127 $\pm$ 21,4 ( 9 )	186 $\pm$ 29,4 ( 9 )
10 min.	110 $\pm$ 8,4	83 $\pm$ 4,06	134 $\pm$ 54.9	136 $\pm$ 18,8*	195 $\pm$ 28,9*
20 min.	110 $\pm$ 8,2	82 $\pm$ 4,43	131 $\pm$ 52,3	146 $\pm$ 19.1*	205 $\pm$ 20,5*
30 min.	111 $\pm$ 12,6	83 $\pm$ 3,83	133 $\pm$ 53,7	152 $\pm$ 19,6*	213 $\pm$ 18,0*



**Fig.22** Efecto en el tiempo del DMA,  $10^{-5}$  M, sobre el potencial de acción obtenido en un músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo (NZW). El trazo negro indica condiciones control; el trazo verde tras la perfusión durante 10 minutos con DMA; el trazo azul tras 20 min. y el trazo rojo tras 30 min. Ordenadas: potencial de reposo ( mV ). Abscisas: tiempo ( msec ).



**Fig. 23** Registro típico de potenciales de acción lentos ( $K^+ = 27$  mM; 0,2 Hz) obtenidos en músculos papilares de ventrículo derecho de corazón de conejo (NZW) en condiciones control (trazo negro), o tras la perfusión durante 10 minutos con DMA,  $10^{-5}$  M (trazo verde); tras 20 min. (trazo azul) y tras 30 min. (trazo rojo). Ordenadas: potencial de reposo (mV). Abscisas: tiempo (msec).

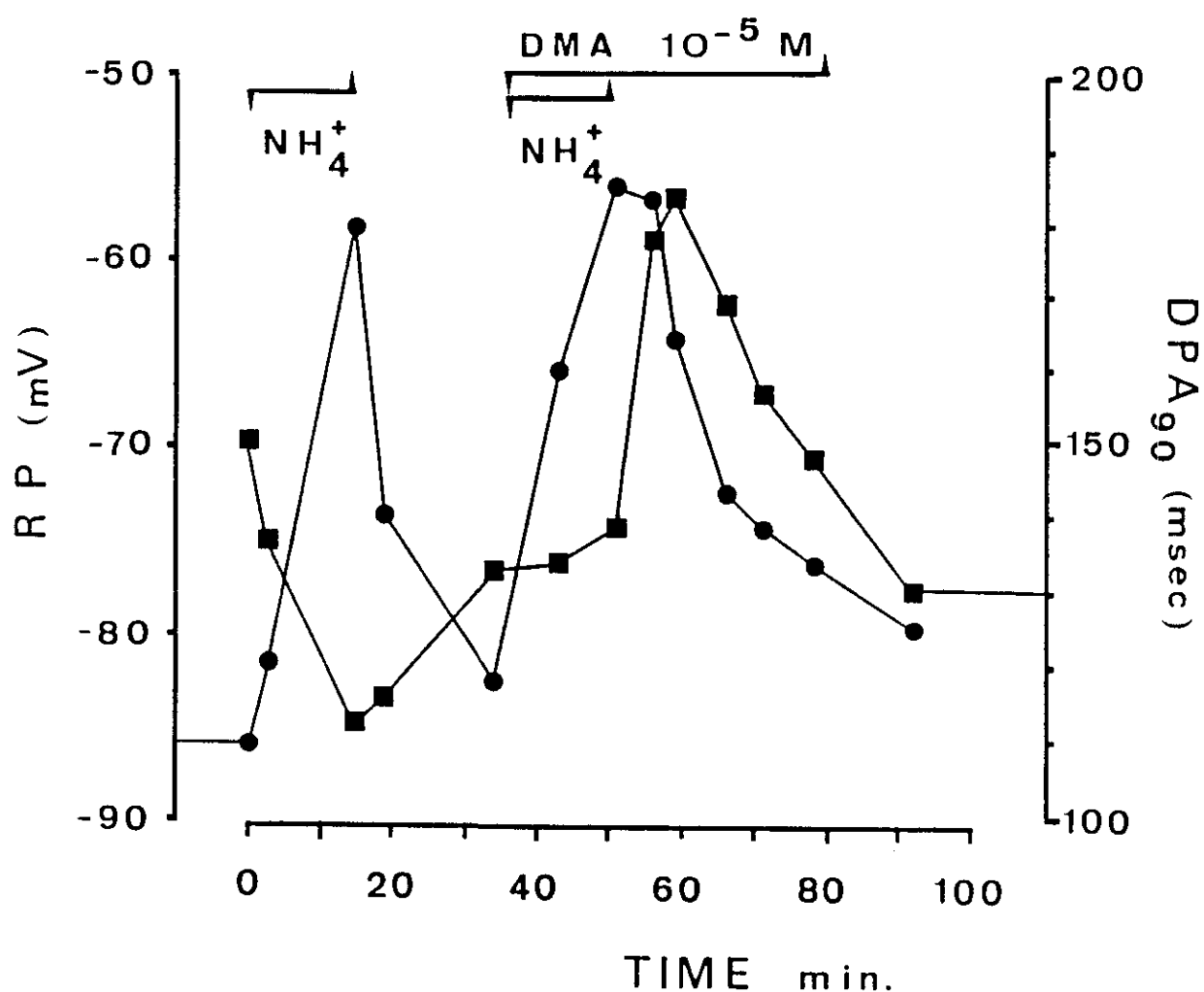
## **II.2. Efectos electrofisiológicos del DMA sobre los potenciales de acción lentos.**

La figura 23 muestra el resultado de 1 de los 2 experimentos realizados con DMA  $10^{-5}$  M para estudiar los potenciales de acción lentos en el músculo papilar de conejo. Tras la perfusión durante 30 minutos se apreció un incremento de la duración del potencial de acción lento, con una evolución temporal superponible al efecto obtenido sobre los potenciales de acción rápida. Resultados cualitativamente similares fueron apreciados en ambos experimentos.

## **II.3. Efecto de la perfusión con DMA sobre las alteraciones electrofisiológicas inducidas por carga ácida.**

La figura 24 muestra los efectos típicos del DMA  $10^{-5}$  M sobre el potencial de reposo y la duración del potencial de acción al 90 % de la repolarización en presencia de una carga ácida.

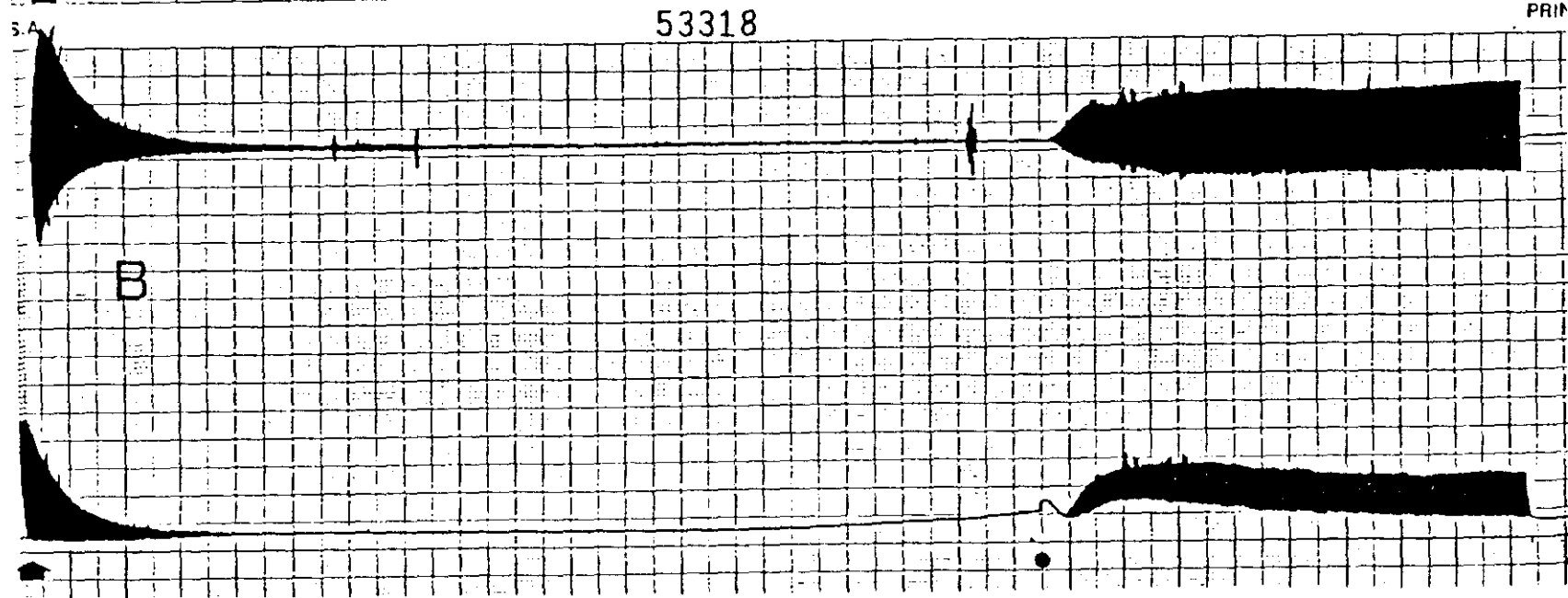
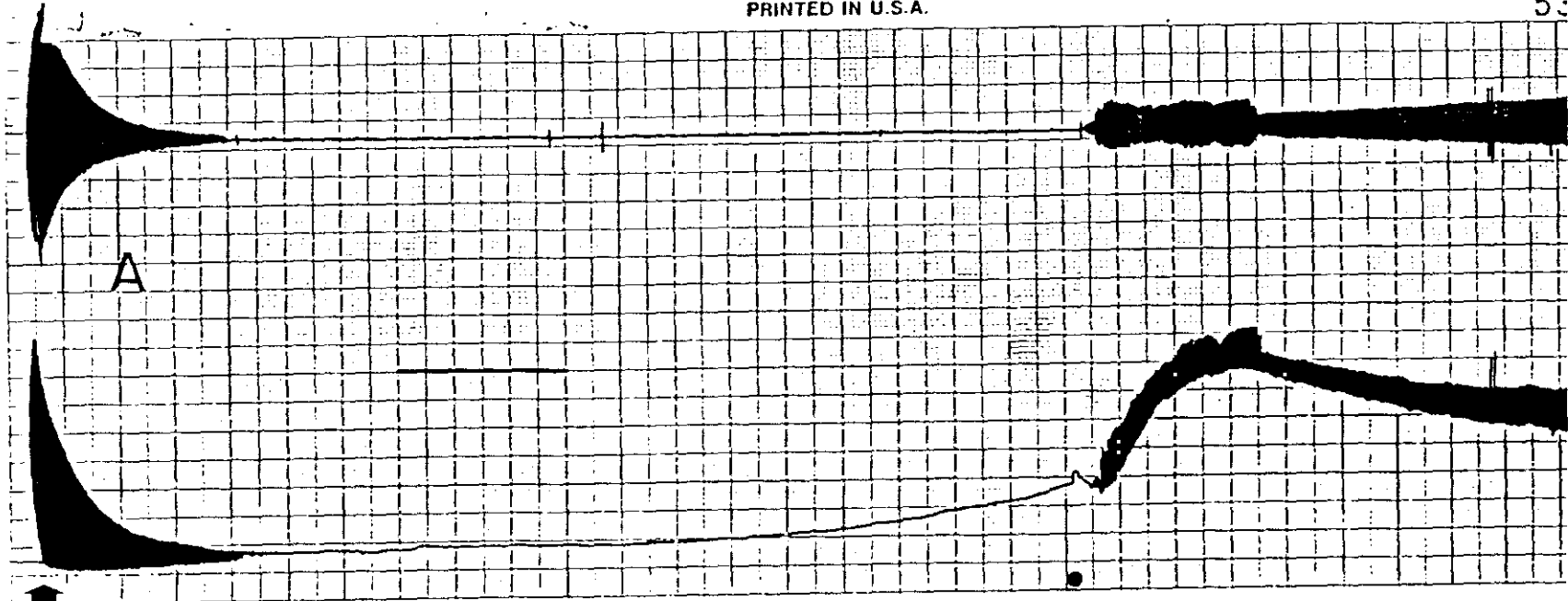
La superfusión de un músculo papilar con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  produjo una despolarización de 25 mV que se vió acompañada de una disminución de la duración del potencial de acción de 40 msec. El cese de la superfusión con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  produjo una repolarización hasta valores iniciales y un aumento de la duración del potencial de acción hasta valores intermedios.



**Fig. 24.** Efectos característicos del DMA,  $10^{-5} \text{ M}$  sobre las respuestas electrofisiológicas de músculos papilares aislados, obtenidos del ventrículo derecho del corazón de conejo (NZW) y estimulados a 1 Hz, inducidas por el cloruro amónico (20 mM, 15 min.) sobre el potencial de reposo (RP) y la duración del potencial de acción (DPA<sub>90</sub>).

La reintroducción de la superfusión con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  en presencia de DMA  $10^{-5}$  M produjo una despolarización de similar magnitud que la obtenida en los experimentos de control sin que se afectara sensiblemente la duración del potencial de acción. La carga ácida obtenida por el cese de la superfusión con  $\text{Cl}(\text{NH}_4)$  en presencia de DMA produjo un retardo muy considerable en la repolarización, sin llegar a obtenerse los valores control, y un aumento muy significativo de la duración del potencial de acción, si bien éste efecto no fue mantenido a lo largo del tiempo.





PRIN

**Fig.25.** Registro típico de los efectos de la isquemia global sobre la tensión desarrollada (trazo inferior) y su primera derivada (trazo superior). **A.** En condiciones control. **B.** Bajo tratamiento con DMA  $10^{-5}$  M durante los 30 min. previos a la isquemia y durante la reperfusión.

### **III. ISQUEMIA GLOBAL.**

#### **III.1. Estudio sobre miocardio isquémico.**

La figura 25,a muestra un experimento típico de los efectos de la isquemia-reperfusión sobre la contractilidad de un tabique interventricular en condiciones control.

La isquemia de 60 minutos produjo una rápida disminución de la tensión desarrollada llegándose prácticamente a anular a los 10 minutos del inicio de la isquemia. Existió un incremento de la tensión de reposo a lo largo de todo el periodo de isquemia. Tras la perfusión, se produjo un incremento súbito de la tensión de reposo que se acompañó de una progresiva recuperación parcial de la contractilidad.

En condiciones control (n=7) el incremento de la tensión de reposo fue de  $13.1 \pm 0.93$  g sobre la tensión basal. La recuperación de la contractilidad tras 30 minutos de perfusión fue de un  $19.7 \pm 1.7$  % frente a los valores controles de contractilidad anteriores a la isquemia (tabla V,a).

#### **III.2. Efectos del DMA sobre la isquemia-reperfusión.**

Los efectos del DMA  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M perfundido

durante 30 minutos previos a la isquemia y durante la reperfusión, pueden apreciarse en el registro típico de la figura 25,b. Sus datos numéricos se encuentran recogidos en la tabla V,a. El DMA produjo una disminución significativa dosis-dependiente del máximo incremento de tensión de reposo, llegando a ser de sólo  $5.65 \pm 0.87$  g. a la concentración de  $10^{-5}$  M. Este efecto se acompañó de un incremento del porcentaje de recuperación tras la reperfusión durante 30 minutos. Este incremento también fué dosis-dependiente, alcanzándose significación a la concentración de  $10^{-6}$  M. Los valores obtenidos a la concentración de  $10^{-5}$  M,  $45,7 \pm 5.0$  %, alcanzan valores casi 2 veces superiores a los valores de control (19,7 %).

Cuando el DMA  $10^{-5}$  M fué perfundido únicamente durante la reperfusión, el incremento de la tensión de reposo y el porcentaje de recuperación tras la reperfusión alcanzaron unos valores similares a los obtenidos en los controles de isquemia-reperfusión (tabla V,b).

### III.3. Efectos del EIPA y del DEA sobre la isquemia-reperfusión.

Los efectos de dosis equipotentes a la del DMA  $10^{-5}$  M, EIPA  $10^{-6}$  y DEA  $2 \cdot 10^{-6}$  M, capaces de inhibir el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en similar magnitud, se encuentran recogidos en la tabla V,a.

**Tabla V.** Efecto de diversos inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sobre el máximo incremento de la tensión de reposo, expresado en g., y el % de recuperación de contracción tras 1 h. de isquemia global y 30 min de perfusión en el septum interventricular de conejo. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

**A.** Tratamiento con fármaco 30 min antes y durante la perfusión.

	n	tens. reposo	% recup.
Control	7	$13.10 \pm 0.93$	$19.7 \pm 1.7$
DMA, $10^{-7}$	3	$11.95 \pm 2.35$	$21.0 \pm 4.2$
DMA, $10^{-6}$	5	$7.48 \pm 1.24^{**}$	$32.8 \pm 7.4^*$
DMA, $10^{-5}$	6	$5.65 \pm 0.87^{**}$	$45.7 \pm 5.0^{**}$
EIPA, $10^{-6}$	4	$6.01 \pm 1.01^{**}$	$39.4 \pm 4.8^{**}$
DEA, $2 \times 10^{-6}$	4	$5.48 \pm 2.24^{**}$	$46.3 \pm 6.6^{**}$

**B.** Tratamiento únicamente durante perfusión.

Control	7	$13.1 \pm 0.93$	$19.7 \pm 1.7$
DMA, $10^{-5}$	6	$12.32 \pm 1.07$	$17.7 \pm 4.8$

Los valores obtenidos del máximo incremento en la tensión de reposo y el porcentaje de recuperación de contractilidad tras la reperfusión no difirieron de forma estadísticamente significativa entre los 3 derivados del amiloride, pero si lo hicieron frente a los valores de control.

#### **III.4. Efectos del SITS y del SITS + DMA sobre la isquemia-reperfusión.**

Los efectos de la perfusión con SITS durante los 30 minutos previos a la isquemia vienen recogidos en la tabla VI,a. En ella se muestra que no existen diferencias en los parámetros valorados frente a los valores control. La asociación SITS + DMA  $10^{-5}$  M no produjo variación alguna frente a los parámetros de contractilidad obtenidos con la perfusión única de DMA a la misma dosis.

#### **III.5. Efectos del DMA sobre la isquemia de bajo flujo.**

Los efectos del DMA  $10^{-5}$  M administrado durante la isquemia de bajo flujo se encuentran recogidos en la tabla VI,b.

En condiciones control, existió un incremento de  $5.8 \pm 0.6$  g. en la tensión de reposo sobre

los valores de tensión basal. El porcentaje de recuperación de contractilidad tras 30 minutos de reperfusión de altoo flujo fue de  $59.5 \pm 27 \%$ . En los experimentos en los que se perfundió DMA  $10^{-5}$  M durante el bajo flujo no se observaron variaciones en ambos parámetros frente a los valores de experimentos utilizados como controles.



#### IV. RESULTADOS SOBRE MOVIMIENTOS CON RADIOCALCIO.

##### IV.1. Efecto del DMA $10^{-5}$ M sobre la captación de $^{47}\text{Ca}$ en la isquemia del tabique interventricular.

En la figura 26 se encuentra representado el efecto del DMA  $10^{-5}$  M sobre la captación de  $^{47}\text{Ca}$  tras la perfusión con este isótopo del tabique inter- ventricular. En condiciones control, existe un acúmulo progresivo de calcio radiactivo durante los primeros 40 minutos. El cese de la perfusión durante 60 minutos en la isquemia global, da como resultado una disminución de la captación del conteo radioactivo debido al vaciamiento de los vasos, y la consecuente pérdida de líquido nutricio marcado. Al comenzar la reperfusión con líquido nutricio conteniendo  $^{47}\text{Ca}$  se produjo un brusco incremento en su captación.

La captación de  $^{47}\text{Ca}$  tras los 30 min de la reperfusión, expresada como porcentaje frente al calcio captado durante los 40 min. de perfusión preisquemia fue del  $31,8 \pm 1,8 \%$ .

En experimentos en presencia de DMA,  $10^{-5}$  M, no existieron alteraciones en la captación total de calcio, ni tampoco modificaciones en las constantes de velocidad de captación ( $38,2 \pm 1,20 \%$ ).

**Tabla VI. A.** Efectos del SITS ( $10^{-4}$  M) y del SITS + DMA ( $10^{-5}$  M) sobre los parámetros de contractilidad en la isquemia-reperfusión. **B.** Efectos del DMA,  $10^{-5}$  M, sobre los parámetros de contractilidad en la isquemia de bajo flujo.

**A.**

	n	tens. reposo	% recuperación
Control	7	$13.10 \pm 0.93$	$19.7 \pm 7.0$
SITS	2	$8.67 \pm 0.53$	$18.3 \pm 1.7$
SITS+DMA	3	$5.40 \pm 0.70$	$42.8 \pm 20.0$

**B.**

Control	4	$5.8 \pm 0.64$	$59.5 \pm 27.2$
DMA	3	$5.4 \pm 0.86$	$61.5 \pm 24.1$

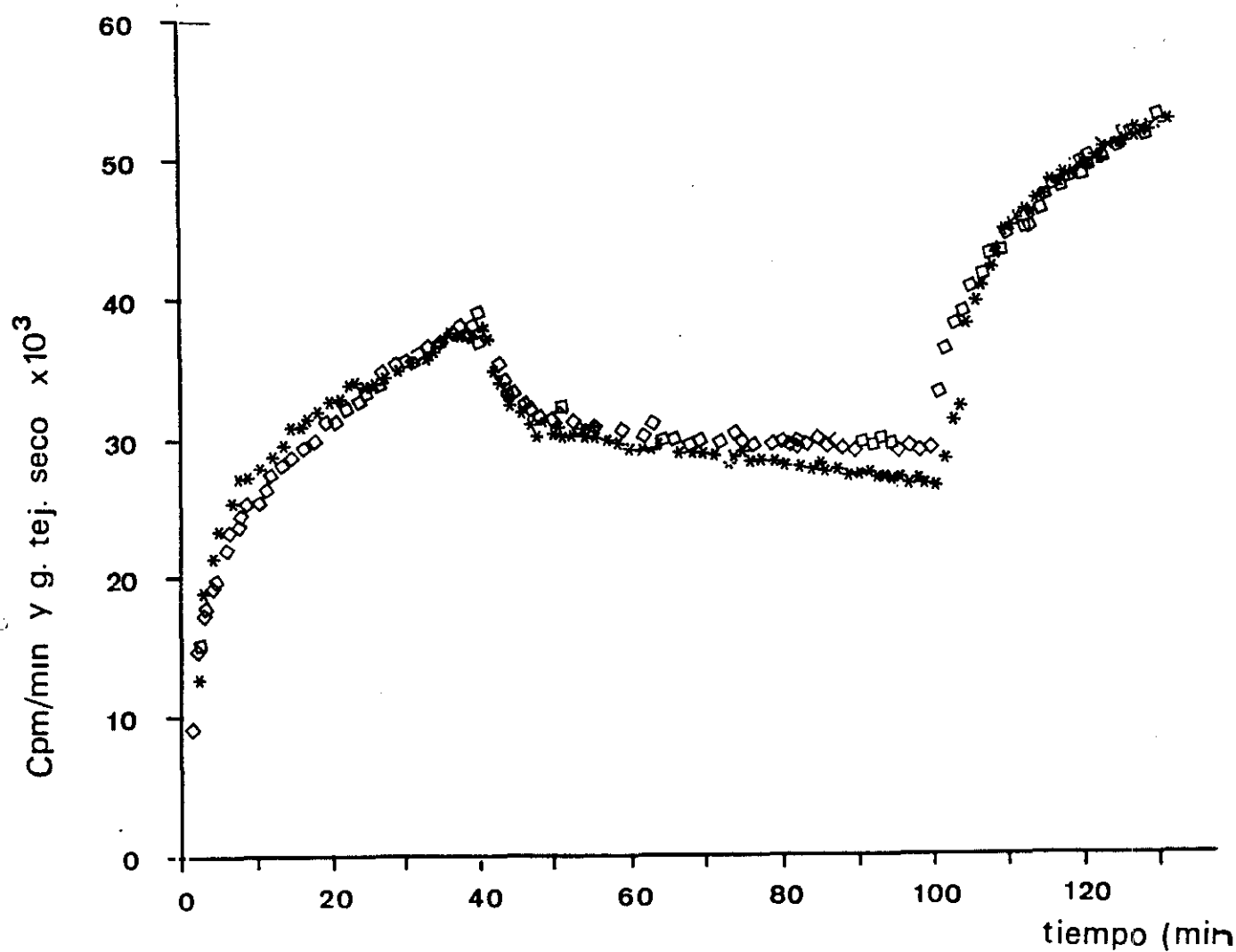


Fig.26. Captación de  $^{47}\text{Ca}$  frente al tiempo en el septum interventricular aislado y perfundido del corazón de conejo. Control ( $\circ$ ). Bajo tratamiento con DMA,  $10^{-5}$  M, 40 min antes de la isquemia y durante la reperfusión (\*).

## V. ANALISIS DEL CONTENIDO DE CALCIO TOTAL.

El análisis del calcio total obtenido en los experimentos de isquemia- reperfusion demostró que en condiciones control la cantidad total de calcio era de  $11.90 \pm 2.3$  nmol/Kg de tejido seco (n=7) frente a los valores de  $10.16 \pm 2.2$  nmol/Kg de tejido seco, cuando se utilizó DMA  $10^{-5}$  M durante la preischemia y la reperfusion. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos en estos experimentos.

## VI. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

La figura 27 muestra una panorámica general de la imagen correspondiente a los experimentos de contracción control. Se puede apreciar la existencia de escaso edema intracelular y una buena organización mitocondrial. Los filamentos se encuentran conservados apreciándose interrupciones puntuales. En el detalle de la figura se aprecia un disco intercalar bien conservado, con uniones intermedias y desmosomas.

La figura 28 muestra la imagen correspondiente a un experimento control de isquemia global. Se aprecia intenso edema intracelular, así como una dislaceración de los filamentos miocárdicos. También son observadas bandas de contractura, características del daño isquémico sobre el miocardio.

La figura 29 muestra la imagen correspondiente a un experimento de isquemia global. Durante los 30 minutos previos a la isquemia se perfundió TYrode junto con DMA  $10^{-5}$  M. Se aprecia una panorámica de tejido con moderadas alteraciones, fundamentalmente edema intracelular. Mitocondrias bien conservadas. Existe una buena organización de las estructuras celulares.

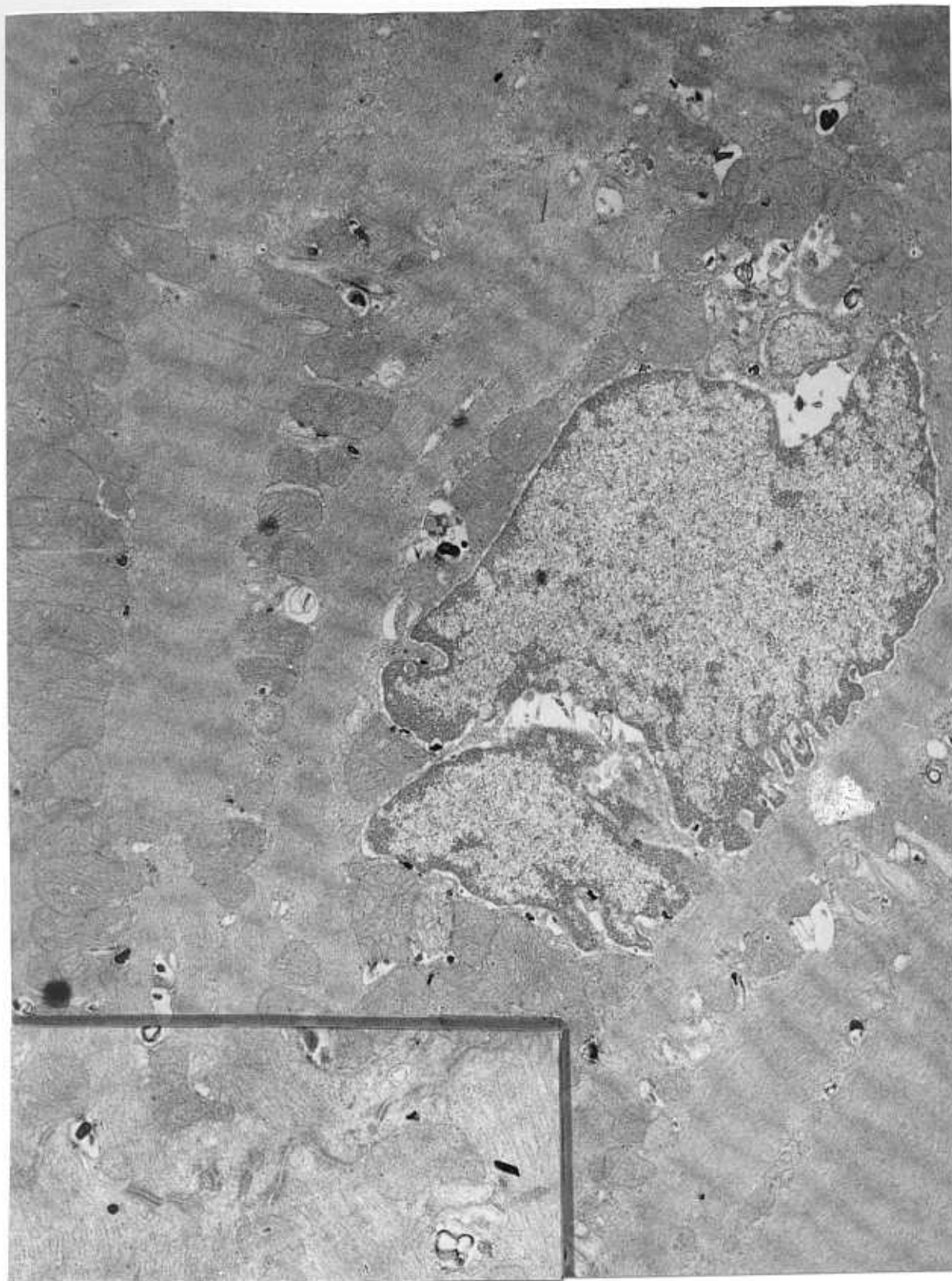


Fig. 27. Imagen obtenida a 11.500 aumentos correspondiente a un corte de miocardio no isquémico obtenido de un experimento de contracción control, tras 2 horas de perfusión con Tyrode. Detalle realizado a 16.500 aumentos.

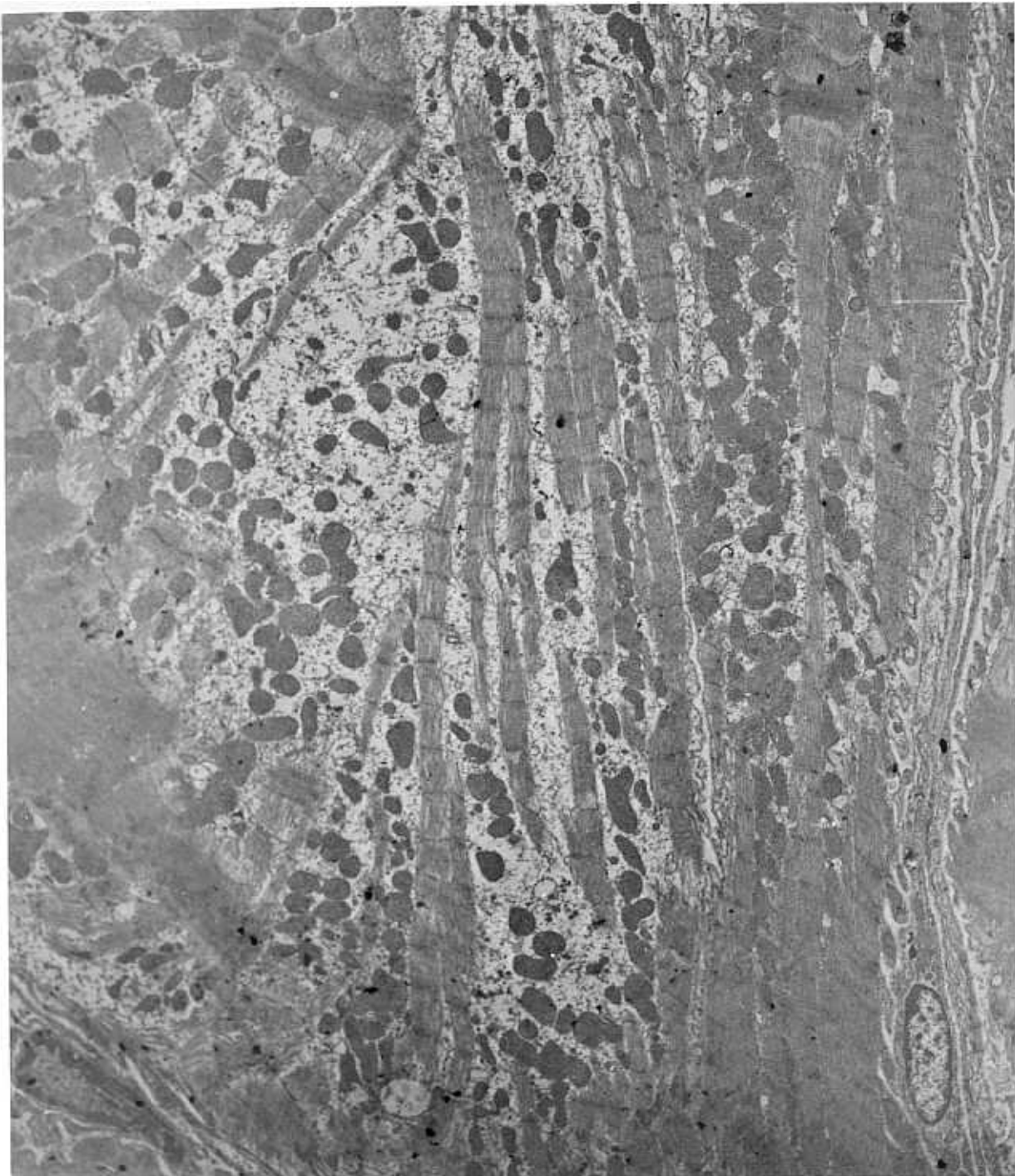
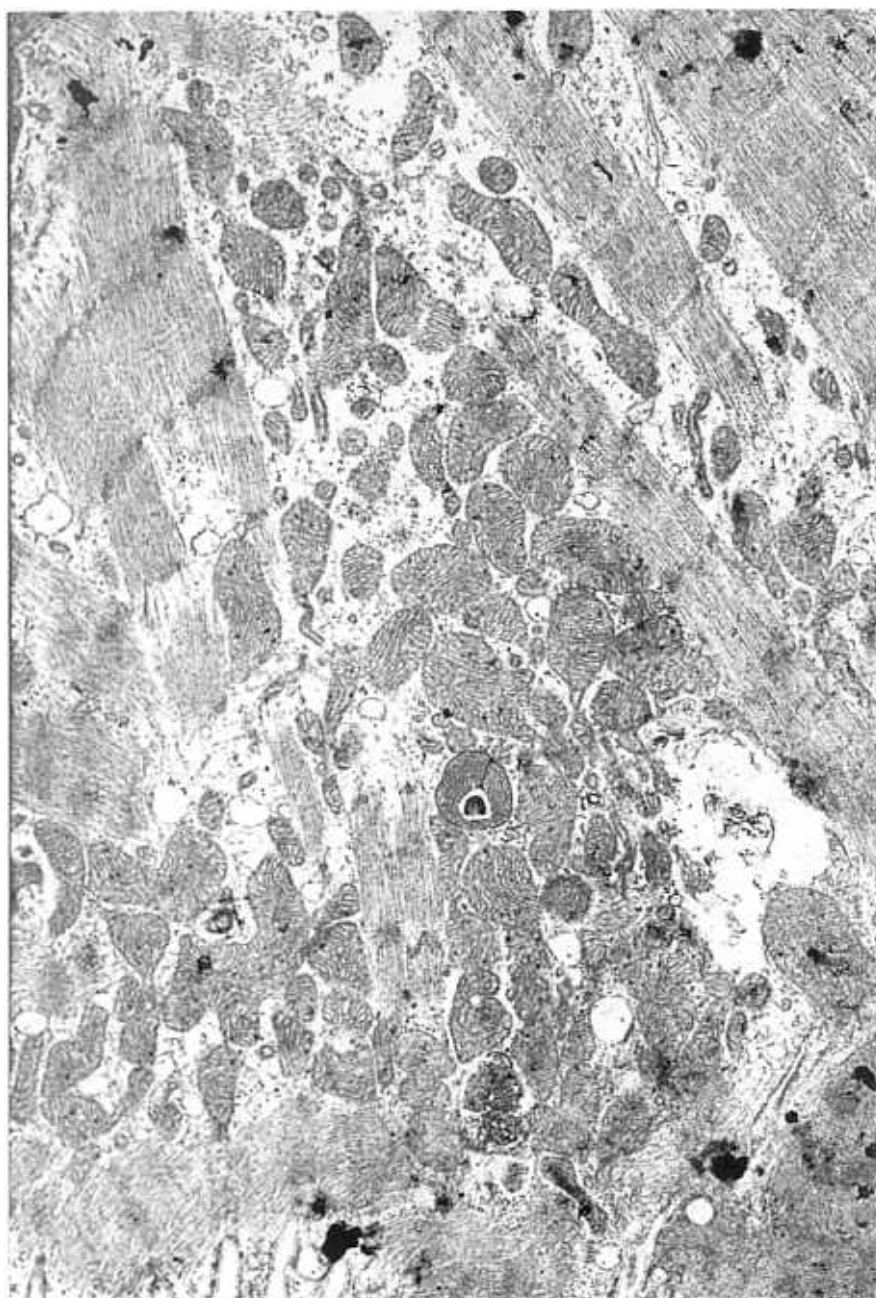


Fig. 28. Imagen característica correspondiente a una preparación de septum interventricular sometido a 1 h. de ischemia global y 30 min. de reperfusion (5.900 X).



**Fig. 29.** Imagen característica correspondiente a un septum interventricular sometido a 1 h. de ischemia global, tratado previamente (30 min. y durante la reperfusion (30 min) con DMA,  $10^{-5}$  M (5.900 X).



## DISCUSSION

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que en el miocardio no isquémico del corazón de conejo en condiciones "in vitro", los derivados del amiloride producen un efecto inotrope negativo en un rango de concentraciones a las cuales el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se encuentra inhibido. Más aún, las dosis capaces de inhibir este sistema son también capaces de proteger el miocardio frente a los efectos deletéreos inducidos por la isquemia.

ACCION INOTROPA NEGATIVA. El efecto inotrope negativo obtenido con el DMA ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M) presenta una clara dosis-dependencia, siendo a la concentración de  $10^{-5}$  M relativamente discreto (aproximadamente -35 %). Este efecto inotrope negativo no se vió acompañado de cambios significativos en la duración total del estado activo, aunque sí corrió parejo con disminuciones proporcionales en la máxima velocidad de contracción y de relajación. Más aún, los efectos obtenidos en este rango de dosis fueron reversibles tras un tiempo adecuado de perfusión con solución nutritiva sin fármaco.

La disminución de contractilidad observada, así como la disminución de la máxima velocidad de contracción y de relajación supera ampliamente los límites atribuibles a la máxima pérdida de contractilidad observada en condiciones control (aproximadamente 5 %), por lo que

necesariamente deben de ser atribuibles a la intervención farmacológica realizada.

La disminución de contractilidad, que se acompaña de una disminución proporcional y paralela tanto de la máxima velocidad de contracción como de la de relajación, parece indicar que el/los mecanismo/s inducidos por la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ocurre/n tanto sobre los fenómenos que dan lugar a la activación de la maquinaria contráctil así como, de manera proporcional, sobre los fenómenos que producen la deactivación de la contracción, sugiriendo un mecanismo inespecífico de actuación.

En cualquier caso, esta disminución de la contractilidad no puede ser atribuible a variaciones de la tensión de reposo puesto que a lo largo del tratamiento farmacológico no existieron diferencias estadísticamente significativas frente al control en relación a este parámetro.

Sorprende el hecho de que el tiempo que se precisa para alcanzar la máxima disminución de la contractilidad ocurra aproximadamente a los 30 minutos. Este tipo de respuesta tan lenta parece descartar que el efecto inotrope negativo pueda ser atribuible a un mecanismo de tipo receptorial (p.e. bloqueo adrenérgico) o a una inhibición de los canales lentos de entrada del

calcio.

El efecto inotrope negativo obtenido con las dosis mayores de DMA,  $10^{-4}$  M, es más rápido aunque se acompaña de pérdidas de excitabilidad así como de recuperación incompleta de contractilidad miocárdica tras el lavado. Efectos irreversibles y pérdida de contractilidad espontánea junto con una importante caída progresiva del contenido de fosfatos de alta energía también ha sido descrito por Imai y cols. (1991) en el corazón de rata expuesto a muy altas concentraciones de etil-isopropil-amiloride. Es difícil interpretar tales efectos en base a un mecanismo de acción pero, en cualquier caso, dichos efectos pudieran no ser atribuibles al bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  per sé puesto que esta concentración se encuentra un orden de magnitud por encima de la que se precisa para bloquear al 100 % el intercambiador en otras estructuras como el músculo esquelético de pollo o fibroblastos humanos (Vigne y cols., 1984) o de la que, en nuestras condiciones experimentales, inhibe de manera sustancial la recuperación de contractilidad tras una carga ácida. Por ello, los efectos de muy altas dosis de DMA pudieran ser quizás atribuibles a otros mecanismos tóxicos inherentes a estas sustancias, pero diferentes de los descritos anteriormente.

EFFECTO INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Las concentraciones de DMA que produjeron efectos inotrope-

negativos fueron capaces de potenciar la inotropia negativa originada por el procedimiento de la carga ácida. Este potenciamiento, al contrario de lo que sucedía en los experimentos de contractilidad en condiciones control, ocurre en los primeros minutos (5 min. de perfusión junto al  $\text{Cl}(\text{NH}_4) + 2$  min. en carga ácida), por lo que el mecanismo potenciador parece que esté directamente relacionado con el efecto inmediato del bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Más aún, el DMA prolonga la duración de la inotropia negativa de la carga ácida de forma dosis dependiente, manteniéndose relativamente bien en el tiempo el efecto obtenido con la máxima dosis utilizada,  $10^{-5}$  M. Ello indica que el bloqueo del intercambiador es prácticamente completo y está de acuerdo con otros resultados experimentales ya comentados (Vigne y cols., 1984).

AUSENCIA DE EFECTOS SOBRE EL INTERCAMBIADOR  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . El papel regulador sobre el  $\text{pH}_i$  mediado por el sistema de intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  es materia de controversia pues si bien Vaughan-Jones (1979) describió alteraciones en ambos sentidos del  $\text{pH}_i$  en fibras de Purkinje de oveja cuando se alteraba el contenido intracelular de  $\text{Cl}^-$ , González y Clancy (1981) han descartado que este sistema se utilice en la regulación del  $\text{pH}_i$ . En nuestro caso, los efectos del DMA  $10^{-5}$  M en medio carente nominalmente de  $\text{HCO}_3^-$  (Hepes,  $\text{pH} = 7.4$ ) mostraron un patrón de respuesta similar al obtenido en presencia de Tyrode normal, si bien el efecto inotrope

negativo fué más pronunciado. El estudio de los efectos del DMA  $10^{-5}$  M en medio nutricio Tyrode en presencia del SITS,  $10^{-4}$  M, dosis que bloquea el sistema de intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en estructuras cardíacas (Vaughan-Jones, 1979), mostró que el SITS no modifica la respuesta contráctil del miocardio al DMA. Por ello cabría concluir que el mayor incremento de respuesta del DMA en medio HEPES podría estar relacionado con otras modificaciones contenidas en este líquido nutricio, pero no guardar relación con una hipotética modificación por el DMA del sistema de intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ .

SELECTIVIDAD DE ACCION DEL DMA. Demostrada la acción bloqueante del DMA sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  realizado con la técnica de la carga ácida, y descartados los efectos sobre el sistema de intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  o sobre mecanismos mediados por receptor, uno de los problemas trascendentes en la discusión de las acciones antiisquémicas del DMA es su selectividad de efectos a la concentración utilizada más frecuentemente,  $10^{-5}$  M.

Los estudios electrofisiológicos realizados sobre el potencial de acción rápido del músculo papilar mostraron que no se modifica la fase 0 del potencial de acción ni tampoco el potencial de reposo, por lo que, en principio, no está modificada la  $g_{\text{Na}}$  a través de los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje- dependientes ni tampoco los

mecanismos que mantienen el potencial de reposo. Sin embargo, el DMA produce un ligero alargamiento de la duración del potencial de acción tanto al 50% (+15%) como al 90% (+12%) de la repolarización de forma dosis- y tiempo- dependiente. Más aún, y al igual que lo observado en los estudios de contractilidad, esta prolongación del potencial de acción es un evento que tarda mucho tiempo en llegar al máximo, guardando una evolución temporal superponible a la que ocurre en los estudios de contractilidad. De hecho, parece que existe una asociación entre el efecto inotrope negativo y el incremento en la duración del potencial de acción.

Este aumento de la duración del potencial de acción podría ser atribuible tanto a un aumento de la conductancia al  $\text{Ca}^{++}$  a través de los canales lentos (aumento de  $i_{s_i}$ ), como a una inhibición de la salida del  $\text{K}^+$  intracelular. Con el fin de diferenciar estos posibles efectos se realizaron los estudios con potenciales de acción lentos calcio-dependientes. Una vez más se evidenció que el DMA a la dosis de  $10^{-5}$  M producía un efecto tiempo-dependiente prolongando ligeramente la duración del potencial de acción lento. No obstante, el incremento de  $g_{\text{Ca}}$  es lo suficientemente pequeño como para no observarse modificaciones significativas en la cinética de captación de  $^{47}\text{Ca}$  en el septum interventricular en condiciones no isquémicas. Por ello, cabría concluir que el DMA produce un efecto inotrope negativo con un ligero aumento

paradójico de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a través de los canales lentos, aunque en nuestro estudio no se ha descartado un posible efecto adicional del DMA inhibiendo la salida de  $\text{K}^+$  del medio intracelular (inhibición de  $i_x$ ).

Es interesante el hecho de que -otra vez más- el incremento de duración del potencial de acción lento ocurre lentamente y ello sugiere que este incremento no guarda relación directa con una interacción a nivel del canal, ya que sustancias que incrementan la  $i_{s_i}$  presentan efectos sobre el mismo más rápidos. Cabría por todo ello suponer que los efectos sobre contractilidad y propiedades electrofisiológicas podrían ser consecuencia de un único mecanismo, sin que existiera relación causal entre ambos.

Cuando se estudiaron los efectos del DMA sobre los parámetros electrofisiológicos tras la acidificación del miocardio mediante carga ácida con el  $\text{ClNH}_4$ , una vez más se observó que el DMA producía un alargamiento muy pronunciado de la duración del potencial de acción -aunque no mantenido- y un retardo en los fenómenos de repolarización. El DMA, por lo tanto, una vez más, prolongó de manera muy notables los efectos de la acidificación.

Sería interesante conocer la posible contribución de la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a una hipotética disminución de la actividad del



intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . De hecho, en cultivos celulares de células cardíacas de pollo y rata expuestas a altas concentraciones de ouabaina, el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se ha mostrado como la vía mayoritaria para la captación del  $\text{Na}^+$ ; el bloqueo en estas condiciones mediante inhibidores de los 5-5' N-derivados del amiloride disminuyen la entrada de  $^{45}\text{Ca}$  a través del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (Frelin y cols., 1984). Estos fármacos carecen de efectos directos sobre la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (Vigne y cols., 1982, 1983; Siegl, 1984; Frelin y cols., 1988), no obstante es difícil diferenciar la posible contribución a la inotropia negativa de la inhibición indirecta de este intercambiador por el DMA en preparaciones de miocardio que desarrollen trabajo y en ausencia de dosis elevadas de digital.

HIPOTESIS SOBRE EL MECANISMO INOTROPICO NEGATIVO. Es difícil interpretar los resultados anteriormente comentados, si bien todos estos datos en su conjunto sugieren que el DMA a la dosis de  $10^{-5}$  M y el consecuente bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pudiera tener como consecuencia una acidosis intracelular, como ya ha sido propuesto por Pérez y otros (1990) para explicar los efectos del dietil-amiloride sobre el miocardio de conejo. En defensa de esta hipótesis estaría:

- 1) La buena correlación entre las dosis que se precisan

para producir el efecto inotrope negativo y aquellas precisas para bloquear el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Este sistema es el mecanismo principal de transporte que retira el ácido del interior celular (Roos y Boron, 1981).

2) El hecho de que para obtener el máximo efecto se precise el paso de una gran cantidad de tiempo. Ello sugiere que este hipotético efecto sobre  $\text{pH}_i$  podría requerir sobrepasar la relativamente alta capacidad buffer del músculo miocárdico (Ellis y Thomas, 1976; Garlick y cols., 1979) para llegar a ser evidente.

3) La aparente contradicción de un fármaco inotrope negativo que, paradójicamente, simultáneamente incrementa ligeramente la conductancia del calcio a través de los canales lentos. La acidosis intracelular produce una importante disminución de la contractilidad miocárdica tanto por una pérdida de sensibilidad de las proteínas contráctiles hacia el  $\text{Ca}^{++}$  como por la depresión de la captación del mismo y de la velocidad de su acumulación en el retículo sarcoplásmico (Fabiato y Fabiato, 1978; Blanchard y Solaro, 1984). El descenso de 1,2 unidades de pH incrementan por un factor de 5 las concentraciones de calcio precisas para desarrollar el mismo nivel de contracción en miocitos desprovistos de membrana, obtenidos de miocardio de rata (Fabiato y Fabiato, 1978). Por ello, disminuciones discretas de  $\text{pH}_i$  pueden sobrepasar notablemente el incremento de contractilidad inducido por

ligeros incrementos de  $is_i$ .

4) El hecho de que la carga ácida inducida por  $NH_4Cl$  produzca un efecto intrópico negativo y que este efecto se mantenga a lo largo del tiempo en presencia de DMA  $10^{-5}$  M.

5) El hecho de que la inducción de acidosis intracelular obtenida al incrementar la concentración de  $CO_2$  en el líquido nutricio también incremente la duración del potencial de acción cuando la tensión desarrollada cae hasta el 50% en preparaciones septales similares a la nuestra (Langer, 1982).

No obstante lo anterior, existe un punto por aclarar: si la pérdida de contractilidad es la resultante de una hipotética progresiva acidificación interna, ¿porqué no existe una progresiva pérdida de contractilidad?. Una posible explicación guardaría relación con una retroalimentación negativa de la acidosis sobre las vías metabólicas que producen hidrogeniones o bien que, ante bajadas sustanciales de  $pH_i$ , se activasen otros mecanismos para compensar la acidosis (Roos y Boron, 1981).

#### **ACCION DEL DMA EN LA ISQUEMIA MIOCARDIACA.**

Los resultados de este trabajo indican que

la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  produce una protección del daño originado en el corazón de conejo por el efecto de la isquemia miocárdica en condiciones "in vitro". En efecto, existe una clara relación dosis-efecto del DMA en la mejoría sobre los parámetros mecánicos habituales para evaluar el daño isquémico miocárdico: máximo incremento de tensión de reposo y porcentaje de recuperación de contractilidad tras 30 minutos de reperfusión. En nuestro caso existió mejoría significativa con dosis de DMA de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M. Más aún, esta mejoría fue objetivada directamente mediante técnicas de microscopía electrónica.

Este efecto parece guardar relación con el bloqueo del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y no con otros efectos ligados a la estructura química del DMA puesto que dosis equipotentes de EIPA y DEA (Vigne y cols., 1984) produjeron efectos iguales a los obtenidos con DMA.

Los efectos beneficiosos sólo se lograron cuando se administró el fármaco 30 minutos antes de la isquemia miocárdica, pero no cuando se administraron durante la isquemia y/o la reperfusión. Ello indica que el mecanismo por el cual ejercen sus efectos beneficiosos no guarda relación inmediata con el bloqueo del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Por tanto, no parece probable una hipotética inhibición de forma indirecta del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Por ello, podría concluirse que el efecto antiisquémico

podría estar en relación con una acción indirecta consecuencia de la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , cuando se inhibe durante largo tiempo antes de la isquemia.

Es bien conocido el hecho de que en la isquemia miocárdica se libera una gran cantidad de noradrenalina por un proceso no exocitótico, probablemente a través del sistema de captación neuronal actuando en forma reversa (Richardt et al., 1991). Las concentraciones elevadas de esta catecolamina facilitan la aparición de arritmias e incrementan el área de isquemia (Waldestron et al., 1978). Sería interesante evaluar si este tipo de fármacos presenta efectos sobre la cinética de captación de noradrenalina, así como el posible efecto de la supuesta acidosis intraneuronal inducida por éstos sobre el acúmulo intraneuronal de noradrenalina en situaciones de isquemia.

Se ha descrito que el aumento de los valores de la tensión de reposo que se observan durante el periodo de isquemia están en relación directa con el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracitoplásmico y que este aumento de tensión de reposo ocurre independientemente de que la preparación se contraiga (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982). En nuestro trabajo destaca la gran disminución del máximo incremento de la tensión de reposo obtenida en presencia de DMA  $10^{-5}$  M durante la isquemia, sin que las concentraciones de calcio total se vean modificadas tras la reperusión. Ello, una vez más, sugiere la existencia

de una acidosis previa al bloqueo que disminuiría el incremento de tensión de reposo ante iguales concentraciones de calcio libre intracitosólico. Así, el bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  produciría más acidosis intracelular que en condiciones control e impediría el incremento de la tensión de reposo que correspondería a la concentración de calcio existente en el citoplasma. Es un hecho bien conocido que la acidosis produce una modificación de la afinidad de la troponina C de la maquinaria contráctil (Katz y Hecht, 1969; Ellis y McLeod, 1985).

Paradójicamente el resultado del contenido total del calcio tras el proceso de isquemia- reperusión no se modifica de forma significativa en presencia de DMA. Más aún, cuando se estudió la cinética de incorporación de  $^{47}\text{Ca}$  tras un periodo de isquemia, tampoco se encontraron variaciones apreciables frente a los experimentos control. Estos resultados podrían parecer a priori altamente contradictorios puesto que lo descrito hasta el momento en la literatura, indica que existe correlación estricta entre la cantidad de radiocalcio captado y el porcentaje de recuperación de contractilidad en el septum miocárdico tras la reperusión, así como entre la cantidad de radiocalcio captado en la mitocondria y capacidad de recuperación funcional (Bourdillon y Poole-Wilson, 1982; Nayler, 1981, 1983). Sin embargo, estos resultados han sido obtenidos siempre mediante modificaciones farmacológicas y/o iónicas,

pero nunca con modificaciones del  $\text{pH}_i$  o con fármacos que pudieran crear acidosis intracelular.

Si bien no existen estudios en los que se demuestren efectos cardioprotectivos en la isquemia, sí existen en la anoxia, uno de los mecanismos más importantes que acompañan a la isquemia. Así Bing y cols. (1973) encontraron que la acidosis moderada incrementaba el porcentaje de recuperación de contractilidad tras 1 h. de anoxia en preparaciones de músculo papilar y de trabecula carnae de corazón de rata. La superfusión con Krebs ( $\text{pH}$  6,8 - 7,1 acidificado con  $\text{ClH}$ ) produjo una mayor velocidad de caída de contractilidad durante la anoxia, acompañada de porcentajes de recuperación en la reoxigenación similares a las preanóxicas. A  $\text{pH}$  6,8 se previno la contractura. En corazones de conejo perfundidos con Krebs ( $\text{pH}$  6,8 acidificado con mayor  $\text{CO}_2$ ) también se han descrito efectos similares (Nayler y cols., 1979). La existencia de acidosis inhibe la glicolisis por lo que disminuye la carga osmótica inicial en la isquemia. Además, reduce la inotropia por lo que disminuye el gasto energético y mantiene las reservas de fosfatos de alta energía durante más tiempo. Ambos efectos han sido puestos en relación con protección frente a la isquemia (Bourdillon y Poole-Wilson, 1983; Nayler y cols, 1980). Por ello, no sería aventurado concluir que el efecto cardioprotector descrito en esta tesis para los inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  podría deberse a la inducción de una acidosis intracelular moderada.

**CONCLUSIONES**



1.- El bloqueo farmacológico del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  mediante derivados 5-5' N-disustituidos del amiloride protege al miocardio de las acciones deletéreas inducidas por la isquemia global del septum interventricular aislado y perfundido arterialemnte, del corazón del conejo. Esta protección se objetiva microscópicamente y sobre parámetros contráctiles.

2.- El efecto cardioprotector no guarda relación inmediata con el efecto bloqueante del sistema intercambiador "per se" ya que no se objetiva cuando los fármacos se perfunden durante la reperusión o durante la isquemia de bajo flujo pero sí se obtiene cuando se perfunden 30 minutos antes de la isquemia.

3.- La acción cardio- protectora frente a la isquemia es consecuencia indirecta de la acción bloqueante del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ya que existe igualdad de intensidad de respuesta para dosis bloqueantes equipotentes de los fármacos estructuralmente relacionados. Más aún, en miocardio no isquémico y en experimentos electrofisiológicos se han descartado efectos sobre la conductancia voltage- dependiente al  $\text{Na}^+$  así como sobre los mecanismos involucrados en el mantenimiento del potencial de reposo.

4.- El efecto antiisquémico de estos fármacos puede ser

atribuido a la producción de una ligera acidosis previa a la instauración del estado isquémico. Ello se fundamenta en los efectos obtenidos en miocardio no isquémico sobre parámetros de contractilidad, efectos electrofisiológicos y de cinética de captación de  $^{47}\text{Ca}^{++}$ .

5.- Los resultados aportados en esta tesis indican que la estricta correlación encontrada por la mayoría de autores entre inhibición de captación de calcio y cardioprotección no es una regla universal, siendo -por el momento- los inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  el primer grupo de fármacos que la incumplen.

**BIBLIOGRAFIA**

ABERCROMBIE RF. PUTNAM RW. ROOS A.: The intracellular pH of frog skeletal muscle: its regulation in isotonic solutions., *J Physiol (Lond)*., 345: 175-187 (1983).

ALLEN DG. EISNER DA. ORCHARD CH.: Characterization of oscillations of intracellular calcium concentration in ferret ventricular muscle., *J Physiol (Lond)*., 352: 113-128 (1984).

ALLEN DG. EISNER DA. ORCHARD CH.: Factors influencing free intracellular calcium concentration in quiescent ferret ventricular muscle., *J Physiol (Lond)*., 350: 615-630 (1984).

ALLEN DG. EISNER DA. PIROLO JS. SMITH GL.: The relationship between intracellular calcium and contraction in calcium- overloaded ferret papillary muscles., *J Physiol (Lond)*., 364: 169-182 (1985).

ALLEN DG. KURIHARA S.: The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle., *J Physiol (Lond)*., 327: 79-94 (1982).

ALLEN DG. MORRIS PG. ORCHARD CH. PIROLO JS.: A nuclear magnetic resonance study of metabolism in the ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis., *J Physiol (Lond)*., 361: 185-204 (1985).

ANDERSON SE. MURPHY E. STEENBERGEN C. LONDON RE. CALA PM.: Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca., *Am J Physiol.*, 259(6 Pt 1): 940-948 (1990).

ARONSON PS.: Mechanisms of active H<sup>+</sup> secretion in the proximal tubule., *Am J Physiol.*, 245(6): 647-659 (1983).

ARONSON PS.: Kinetic properties of the plasma membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger., *Annu Rev Physiol.*, 47: 545-560 (1985).

BARLOW CH. CHANCE B.: Ischemic areas in perfused rat hearts: measurement by NADH fluorescence photography., *Science.* (193(4256): 909-910 (1976).

BARLOW CH. HARKEN AH. CHANCE B., Evaluation of cardiac ischemia by NADH fluorescence photography.: *Ann Surg.*, 186(6): 737-740 (1977).

BARRY WH. SMITH TW., Mechanisms of transmembrane calcium movement in cultured chick embryo ventricular cells.: *J Physiol (Lond).*, 325: 243-260 (1982).

BEELEER GW JR. REUTER H.: Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres., *J Physiol (Lond).*, 207(1): 191-209 (1970).

BENOS DJ.: Amiloride: a molecular probe of sodium

transport in tissues and cells., *Am J Physiol.*, 242(3): 131-145 (1982).

BERS DM. ELLIS D.: Intracellular calcium and sodium activity in sheep heart Purkinje fibres. Effect of changes of external sodium and intracellular pH., *Pflugers Arch.*, 393(2): 171-178 (1982).

BING OHL. BROOKS WW. MESSER JV: Heart muscle viability following hypoxia: protective effect of acidosis, *Science*, 180: 1296-1297 (1973).

BLANCHARD EM. SOLARO RJ.: Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH, *Cir. Res.*, 55: 382-391.

BLATTER LA. MCGUIGAN JA.: Intracellular pH regulation in ferret ventricular muscle. The role of Na-H exchange and the influence of metabolic substrates., *Circ Res.*, 68(1): 150-161 (1991).

BOLLI R. PATEL BS. JEROUDI MO. LAI EK. MCCAY PB.: Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron., *J Clin Invest.*, 82(2): 476-485 (1988).

BOLLI R. ZHU WX. THORNBYS JI. O'NEILL PG. ROBERTS R.:

Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs., *Am J Physiol.*, 254(1 Pt 2): 102-114 (1988).

BOUNTRA C. POWELL T. VAUGHAN-JONES RD.: Comparison of intracellular pH transients in single ventricular myocytes and isolated ventricular muscle of guinea-pig., *J Physiol (Lond).*, 424: 343-365 (1990).

BOURDILLON PD. POOLE-WILSON PA.: Effects of ischaemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium., *Cardiovasc Res.*, 15(3): 121-130 (1981).

BOURDILLON PD. POOLE-WILSON PA.: The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium., *Circ Res.*, 50(3): 360-368 (1982).

BUSA WB. CROWE JH. MATSON GB.: Intracellular pH and the metabolic status of dormant and developing *Artemia* embryos., *Arch Biochem Biophys.*, 216(2): 711-718 (1982).

CANDIA OA.: Reduction of chloride fluxes by amiloride across the short-circuited frog skin., *Am J Physiol.*, 234(5): 437-445 (1978).

CARLSSON L. ABRAHAMSSON T. ALMGREN O.: Release of

noradrenaline in myocardial ischemia--importance of local inactivation by neuronal and extraneuronal mechanisms., J Cardiovasc Pharmacol., 8(3): 545-553 (1986).

COVELL JW. POOL PE. BRAUNWALD E.: Effects of acutely induced ischemic heart failure on myocardial high energy phosphate stores., Proc Soc Exp Biol Med., 124(1): 126-131 (1967).

CRAKE T. CREAN PA. SHAPIRO LM. RICKARDS AF. POOLE-WILSON PA.: Coronary sinus pH during percutaneous transluminal coronary angioplasty: early development of acidosis during myocardial ischaemia in man., Br Heart J., 58(2): 110-115 (1987).

CRAKE T. KIRBY MS. POOLE-WILSON PA.: Potassium efflux from the myocardium during hypoxia: role of lactate ions., Cardiovasc Res., 21(12): 886-891 (1987).

CURTIS M JOHNSTON K WALKER M: Arrhythmias and serum potassium during myocardial ischaemia: IRCS Med. Sci., 13: 688-689 (1985).

DART AM. RIEMERSMA RA. SCHOMIG A. UNGAR A.: Metabolic requirements for release of endogenous noradrenaline during myocardial ischaemia and anoxia., Br J Pharmacol., 90(1): 43-50 (1987).



DEITMER JW. ELLIS D.: Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres., J Physiol (Lond)., 304: 471-488 (1980).

DIEZ GIL JL. RAMON JR. LASTRA LA. GARCIA DE JALON PD.: An operative system for treatment of electropharmacological signals with a microprocessor., Comput Programs Biomed., 18(3): 247-258 (1984).

DOBSON JG JR. MAYER SE.: Mechanisms of activation of cardiac glycogen phosphorylase in ischemia and anoxia., Circ Res., 33(4): 412-420 (1973).

EIGLER J. KELTER J. RENNER E.: Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidine--amiloride-HCL (MK 870)--an der isolierten Haut von Amphibien., Klin Wochenschr., 45(14): 737-738 (1967).

EISNER DA. ELLIOTT AC. SMITH GL.: The contribution of intracellular acidosis to the decline of developed pressure in ferret hearts exposed to cyanide., J Physiol (Lond)., 391: 99-108 (1987).

EISNER DA. LEDERER WJ. SHEU SS.: The role of intracellular sodium activity in the anti-arrhythmic action of local anaesthetics in sheep Purkinje fibres., J Physiol (Lond)., 340: 239-257 (1983).

ELLIS D. MACLEOD KT.: Sodium-dependent control of intracellular pH in Purkinje fibres of sheep heart., J Physiol (Lond)., 359: 81-105 (1985).

ELLIS D. THOMAS RC.: Direct measurement of the intracellular pH of mammalian cardiac muscle., J Physiol (Lond)., 262(3): 755-771 (1976).

ERLIJ D.: Salt transport across isolated frog skin., Philos Trans R Soc Lond [Biol]., 262(842): 53-61 (1971).

FABIATO A.: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum., Am J Physiol., 245(1): 1-14 (1983).

FABIATO A. FABIATO F.: Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles., J Physiol (Lond)., 276: 233-255 (1978).

FRELIN C. VIGNE P. LAZDUNSKI M.: The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na<sup>+</sup> concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart., J Biol Chem., 259(14): 8880-8885 (1984).

FRELIN C. VIGNE P. LADOUX A. LAZDUNSKI M.: The regulation of intracellular pH in cells from vertebrates,

Eur J Biochem, 174(1): 3-14.

FRY CH. POOLE-WILSON PA.: Effects of acid-base changes on excitation--contraction coupling in guinea-pig and rabbit cardiac ventricular muscle., J Physiol (Lond)., 313: 141-160 (1981).

FUKUHARA T.: Histochemical, ultrastructural and cytochemical study of reperfusion effect on ischemic myocardial injury., Jpn Circ J., 49(4): 432-445 (1985).

GARLICK PB. RADDA GK. SEELY PJ.: Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance., Biochem. J., 184 : 547-554 (1979).

GLITSCH HG. REUTER H. SCHOLZ H.: The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles., J Physiol (Lond)., 209(1): 25-43 (1970).

GONZALEZ NC. CLANCY RL.: Myocardial intracellular pH regulation during chloride depletion., J Appl Physiol., 51(6): 1630-1634 (1981).

GRINSTEIN S. GOETZ JD. FURUYA W. ROTHSTEIN A. GELFAND EW.: Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in platelets and leukocytes: detection by electronic cell sizing., Am J Physiol., 247(3 Pt 1): 293-298 (1984).

GRINWALD PM.: Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium., J Mol Cell Cardiol., 14(6): 359-365 (1982).

HENDERSON A: Mechanical changes in myocardial ischaemia and anoxia. In: Myocardial ischaemia and Protection, ed. H Refsum, P Jynge, O mjos: : : 3-8 (1983).

HENRY P. SCHUCHLEID R. DAVIS T. WEISS E. SOBEL B.: Myocardial contracture and acumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart, Am. J. physiol., 233: 677-684 (1977).

HESS ML. KRAUSE SM. ROBBINS AD. GREENFIELD LJ.: Excitation-contraction coupling in hypothermic ischemic myocardium., Am J Physiol., 240(3): 336-341 (1981).

IMAI S. SHI A. ISHIBASHI T. NAKAZAWA M.: Na/H exchange is not operative under low-flow ischemic conditions., J. Moll. Cel. Cardiol., 23 : 505-517 (1991).

JACOBUS WE. PORES IH. LUCAS SK. WEISFELDT ML. FLAHERTY JT.: Intracellular acidosis and contractility in the normal and ischemic heart as examined by <sup>31</sup>P NMR., J Mol Cell Cardiol., 14 Suppl 3: 13-20 (1982).

JANSE MJ: Why is incresead adrenergic activity

arrhythmicogenic? In: Adrenergic System and Ventricular in Myocardial Infarction, ed. J Brachmann, A Schomig, Berlin, Springer: : : 353-363 (1989).

JENNINGS RB REIMER KA STEENBERGER C: Myocardial ischemia and reperfusion: role of calcium. In: Control and Manipulation of Calcium Movement, ed. by JR Parratt: : : 273-302 (1985).

JENNINGS RB HAWKINS HK: Ultrastructural changes of acute myocardial ischemia Degradative Processes in Heart and Skeletal Muscle, ed. by K. Wildenthal: : : 295-346 (1980).

JENNINGS RB REIMER K: Myocardial salvage by reperfusion. Proc. IUPHAR 9th Internat. Cong. Pharmacol. The Macmillan Press (London): : : 527-533 (1984).

JENNINGS RB REIMER KA JONES RN PEYTON RB: High energy phosphates, anaerobic glycolysis and irreversibility in ischaemia: Myocardial Injury, ed. JJ Spitzer., : : 403-419 (1983).

JENNINGS RB.: Acute myocardial ischemic injury. Ultrastructural and biochemical studies of the early phase of lethal injury., Arch Inst Cardiol Mex., 50(3): 365-371 (1980).

JENNINGS RB. GANOTE CE.: Structural changes in myocardium

during acute ischemia., Circ Res., 35 Suppl 3: 156-172 (1974).

JENNINGS RB. GANOTE CE. REIMER KA.: Ischemic tissue injury., Am J Pathol., 81(1): 179-198 (1975).

JENNINGS RB. HAWKINS HK. LOWE JE. HILL ML. KLOTMAN S. REIMER KA.: Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog., Am J Pathol., 92(1): 187-214 (1978).

JENNINGS RB. REIMER KA.: Lethal myocardial ischemic injury., Am J Pathol., 102(2): 241-255 (1981).

JENNINGS RB. REIMER KA. HILL ML. MAYER SE.: Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo., Circ Res: 49: 892-900 (1981).

JENNINGS RB. SHEN AC.: Calcium in experimental myocardial ischemia., Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab., 1: 639-655 (1972).

JENNINGS RB. SOMMERS HM. HERDSON PB. KALTENBACH JP.: Ischemic injury of myocardium., Ann N Y Acad Sci., 156(1): 61-78 (1969).

JENNINGS RB. SOMMERS HM. KALTENBACH JP WEST JJ:  
Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic  
injury: Circ. Res., 14: 260-269 (1964).

JENNINGS RB. STEENBERGEN C JR. KINNEY RB. HILL ML.  
REIMER KA.: Comparison of the effect of ischaemia and  
anoxia on the sarcolemma of the dog heart., Eur Heart J.,  
4 Suppl H: 123-137 (1983).

JONES CE. THOMAS JX. PARKER JC. PARKER RE.: Acute  
changes in high energy phosphates, nucleotide derivatives,  
and contractile force in ischaemic and nonischaemic canine  
myocardium following coronary occlusion., Cardiovasc Res.,  
10(3): 275-282 (1976).

KANAIDE H. YOSHIMURA R. MAKINO N. NAKAMURA M.: Regional  
myocardial function and metabolism during acute coronary  
artery occlusion., Am J Physiol., 242(6): 980-989 (1982).

KATZ AM. HECHT HH.: The early "pump" failure of the  
ischemic heart., Am J Med., 47(4): 497-502 (1969).

KIM D. CRAGOE EJ JR. SMITH TW.: Relations among sodium  
pump inhibition, Na-Ca and Na-H exchange activities, and  
Ca-H interaction in cultured chick heart cells., Circ Res.,  
60(2): 185-193 (1987).

KLEBER AG.: Resting membrane potential, extracellular

potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts., *Circ Res.*, 52(4): 442-450 (1983).

KOSTYUK P. KRISHTAL O. PIDOPLICHKO V.: Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurones., *J Physiol (Lond)*., 310: 403-421 (1981).

KRISHTAL OA. PIDOPLICHKO VI. SHAKHOVALOV Y.: Conductance of the calcium channel in the membrane of snail neurones, *J Physiol (Lond)*., 310: 423-434 (1981).

KRULWICH TA.: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters., *Biochim Biophys Acta.*, 726(4): 245-264 (1983).

L'ALLEMAIN G. PARIS S. POUYSSEGUR J.: Role of a Na<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts., *J Biol Chem.*, 260(8): 4877-4883 (1985).

LADLE RO. WALKER JL.: Intracellular chloride activity in frog heart., *J Physiol (Lond)*., 251(2): 549-559 (1975).

LANGER GA.: Binding and movement of calcium in the myocardial cell., *Adv Myocardiol.*, 3: 265-271 (1982).

LANGER GA. BRADY AJ.: The effects of temperature upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular



myocardium. Relation to control of active state., J Gen Physiol., 52(4): 682-713 (1968).

MADSHUS IH.: Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells., Biochem J., 250(1): 1-8 (1988).

MADSHUS IH. OLSNES S.: Selective inhibition of sodium-linked and sodium-independent bicarbonate/chloride antiport in Vero cells., J Biol Chem., 262(16): 7486-7491 (1987).

MOOLENAR WH: Regulation of cytoplasmic pH by Na/H exchange: TIBS: 11: 141-143 (1986).

MURER H. HOPFER U. KINNE R.: Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney., Biochem J., 154(3): 597-604 (1976).

MURPHY E. PERLMAN M. LONDON RE. STEENBERGEN C.: Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium., Circ Res., 68(5): 1250-1258 (1991).

NAYLER WG. FERRARI R. POOLE-WILSON PA. YEPEZ CE.: A protective effect of a mild acidosis on hypoxic heart muscle., J. Mol. Cell. Cardiol., 11 : 1053-1071 (1979).

NAYLER WG.: The role of calcium in the ischemic myocardium., Am J Pathol., 102(2): 262-270 (1981).

NAYLER WG.: Calcium and cell death., Eur Heart J., 4 Suppl C: 33-41 (1983).

NAYLER WG.: The heterogeneity of the slow channel blockers (calcium antagonists)., Int J Cardiol., 3(4): 391-400 (1983).

NAYLER WG. FERRARI R. WILLIAMS A.: Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium., Am J Cardiol., 46(2): 242-248 (1980).

NAYLER WG. MAS-OLIVA J. WILLIAMS AJ.: Cardiovascular receptors and calcium., Circ Res., 46(6 Pt 2): 403-421 (1980).

NORDREHAUG JE.: Malignant arrhythmias in relation to serum potassium values in patients with an acute myocardial infarction., Acta Med Scand Suppl., 647: 101-107 (1981).

NORDREHAUG JE. VON DER LIPPE G.: Hypokalaemia and ventricular fibrillation in acute myocardial infarction., Br Heart J., 50(6): 525-529 (1983).

PEREZ MD. FUEYO J. BARRIGON S.: Negative inotropic effect induced by diethylamiloride (DEA) in rabbit myocardium., J Pharm Pharmacol., 42(9): 667-669 (1990).

PHILIPSON KD.: Symmetry properties of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanism in cardiac sarcolemmal vesicles., *Biochim Biophys Acta.*, 821(2): 367-376 (1985).

PIERCE GN. PHILIPSON KD.:  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange in cardiac sarcolemmal vesicles., *Biochim Biophys Acta.*, 818(2): 109-116 (1985).

PIWNICA-WORMS D. JACOB R. HORRES CR. LIEBERMAN M.:  $\text{Na}/\text{H}$  exchange in cultured chick heart cells.  $\text{pH}_i$  regulation., *J Gen Physiol.*, 85(1): 43-64 (1985).

POOLE-WILSON PA.: Cardioplegia., *Lancet.*, 1(8213): 219-219 (1981).

POOLE-WILSON PA.: Acidosis and contractility of heart muscle., *Ciba Found Symp.*, 87: 58-76 (1982).

POOLE-WILSON PA.: Reduction of infarct size: a misleading concept?: *Postgrad Med J.*, 59 Suppl 3: 95-96 (1983).

RAU EE. SHINE KI. LANGER GA.: Potassium exchange and mechanical performance in anoxic mammalian myocardium., *Am J Physiol.*, 232(1): 85-94 (1977).

REEVES JP. SUTKO JL.: Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(2): 590-594 (1979).

REIMER KA. JENNINGS RB. HILL ML.: Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity., *Circ Res.*, 49(4): 901-911 (1981).

REIMER KA. LOWE JE. RASMUSSEN MM. JENNINGS RB.: The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs., *Circulation.*, 56(5): 786-794 (1977).

REIMER KA. STEENBERGEN C. JENNINGS RB.: Isolated cardiac myocytes: is their response to injury relevant to our understanding of ischemic injury, in vivo., *Lab Invest.*, 53(4): 369-372 (1985).

REISER G. DUHM J.: Transport pathways for lithium ions in neuroblastoma x glioma hybrid cells at 'therapeutic' concentrations of Li+., *Brain Res.*, 252(2): 247-258 (1982).

REUTER H.: Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle., *J Physiol (Lond).*, 242(2): 429-451 (1974).

RICHARDT G HAASS M SCHOMIG A: Calcium antagonist and cardiac noradrenaline release in ischemia: *J Moll Cell Cardiol*: 23: 269-277 (1991).

ROOS A. BORON WF.: Intracellular pH., *Physiol Rev.*, 61(2): 296-434 (1981).

ROSS J JR. FRANKLIN D. SASAYAMA S.: Preload, afterload, and the role of afterload mismatch in the descending limb of cardiac function., *Eur J Cardiol.*, 4 Suppl: 77-86 (1976).

RUIGROK TJ. SLADE AM. VAN DER MEER P. DE MOES D. SINCLAIR DM. POOLE-WILSON PA. MEIJLER FL.: Different effects of thiopental in severe hypoxia, total ischemia, and low-flow ischemia in rat heart muscle., *Anesthesiology.*, 63(2): 172-178 (1985).

RUSSELL JM. BORON WF.: Role of chloride transport in regulation of intracellular pH., *Nature.*, 264(5581): 73-74 (1976).

SCHMALZING G.: Mechanism of depolarization of rat cortical synaptosomes at submicromolar external  $\text{Ca}^{2+}$  activity. The use of  $\text{Ca}^{2+}$  buffers to control the synaptosomal membrane potential., *Biochem J.*, 225(3): 671-680 (1985).

SCHOMIG A. DART AM. DIETZ R. MAYER E. KUBLER W.: Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release., *Circ Res.*, 55(5): 689-701 (1984).

SHEN AC. JENNINGS RB.: Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury., *Am J Pathol.*, 67(3): 417-440 (1972).

SHIMONI Y.: Parameters affecting the slow inward channel repriming process in frog atrium., *J Physiol (Lond)*., 320: 269-291 (1981).

SHRAGO E.: Myocardial adenine nucleotide translocase., *J Mol Cell Cardiol.*, 8(7): 497-500 (1976).

SIEGL PK. CRAGOE EJ JR. TRUMBLE MJ. KACZOROWSKI GJ.: Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 81(10): 3238-3242 (1984).

SPERELAKIS N. SCHNEIDER JA.: A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell., *Am J Cardiol.*, 37(7): 1079-1085 (1976).

SPITZER KW. WALKER JL.: Intracellular chloride activity in quiescent catpapillary muscle., *Am J Physiol.*, 238(4): 487-493 (1980).

STEENBERGEN C. MURPHY E. LEVY L. LONDON RE.: Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart., *Circ Res.*, 60(5): 700-707

(1987).

STEENBERGER C MURPHY E WATTS JA LONDON RE: Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart: Circ Res: 66: 135-146 (1990).

TANI M. NEELY JR.: Role of intracellular  $\text{Na}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$  overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of  $\text{H}^+-\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchange., Circ Res., 65(4): 1045-1056 (1989).

THOMAS RC.: Intracellular pH of snail neurones measured with a new pH-sensitive glass micro-electrode., J Physiol (Lond)., 238(1): 159-180 (1974).

THOMAS RC.: The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones., J Physiol (Lond)., 255(3): 715-735 (1976).

TILLISCH JH. FUNG LK. HOM PM. LANGER GA.: Transient and steady-state effects of sodium and calcium on myocardial contractile response., J Mol Cell Cardiol., 11(2): 137-148 (1979).

TNNESSEN TI. LUDT J. SANDVIG K. OLSNES S.: Bicarbonate/chloride antiport in Vero cells: I. Evidence

for both sodium-linked and sodium-independent exchange.,  
J Cell Physiol., 132(2): 183-191 (1987).

VANHEEL B. DE HEMPTINNE A. LEUSEN I.: Analysis of Cl-  
-HCO<sub>3</sub>(-) exchange during recovery from intracellular  
acidosis in cardiac Purkinje strands., Am J Physiol., 246(5  
Pt 1): 391-400 (1984).

VAUGHAN-JONES RD.: Non-passive chloride distribution in  
mammalian heart muscle: micro-electrode measurement of the  
intracellular chloride activity., J Physiol (Lond)., 295:  
83-109 (1979).

VAUGHAN-JONES RD.: Regulation of chloride in quiescent  
sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular  
chloride and pH-sensitive micro-electrodes., J Physiol  
(Lond)., 295: 111-137 (1979).

VAUGHAN-JONES RD.: An investigation of chloride-bicarbonate  
exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre., J Physiol  
(Lond)., 379: 377-406 (1986).

VAUGHAN-JONES RD. EISNER DA. LEDERER WJ.: The effects of  
intracellular Na on contraction and intracellular pH in  
mammalian cardiac muscle., Adv Myocardiol., 5: 313-330  
(1985).

VAUGHAN-JONES RD. EISNER DA. LEDERER WJ.: Effects of



changes of intracellular pH on contraction in sheep cardiac Purkinje fibers., *J Gen Physiol.*, 89(6): 1015-1032 (1987).

VAUGHAN-JONES RD. LEDERER WJ. EISNER DA.:  $\text{Ca}^{2+}$  ions can affect intracellular pH in mammalian cardiac muscle., *Nature.*, 301(5900): 522-524 (1983).

VIGNE P. FRELIN C. CRAGOE EJ JR. LAZDUNSKI M.: Ethylisopropyl-amiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchange system in various cell types., *Biochem Biophys Res Commun.*, 116(1): 86-90 (1983).

VIGNE P. FRELIN C. CRAGOE EJ JR. LAZDUNSKI M.: Structure-activity relationships of amiloride and certain of its analogues in relation to the blockade of the  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchange system., *Mol Pharmacol.*, 25(1): 131-136 (1984).

VIGNE P. FRELIN C. LAZDUNSKI M.: The amiloride-sensitive  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchange system in skeletal muscle cells in culture., *J Biol Chem.*, 257(16): 9394-9400 (1982).

WALDEGIORGIS G YOUSUFZAI S SHRAGO E: Regulation of adenine nucleotide translocation in the heart - interaction of the ADP/ATP carrier with long chain fatty CoA esters in mitochondria. In: *Myocardial Ischaemia and Protection* ed. H Refsum, P Jynge, O Mjos. Churchill Livingstone, New York: : 52-61 (1983).

WALDESTROM AP. HJALMARSON AC THORNELL : A possible role of noradrenaline in the development of myocardial infarction., Am. Heart J., 95 : 43-51 (1978).

WALLERT MA. FROHLICH O.: Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in isolated myocytes from adult rat heart., Am J Physiol., 257(2 Pt 1): 207-213 (1989).

WEISS J. COUPER GS. HILTBRAND B. SHINE KI.: Role of acidosis in early contractile dysfunction during ischemia: evidence from pHo measurements., Am J Physiol., 247(5 Pt 2): 760-767 (1984).

WEISS J. SHINE KI.: Extracellular K<sup>+</sup> accumulation during myocardial ischemia in isolated rabbit heart., Am J Physiol., 242(4): 619-628 (1982).

WENDE W. BLEIFELD W. MEYER J. STUHLEN HW.: Reduction of the size of acute, experimental myocardial infarction by Verapamil., Basic Res Cardiol., 70(2): 198-208 (1975).

WHITMAN G. KIEVAL R. WETSTEIN L. SEEHOLZER S. MCDONALD G. HARKEN A.: The relationship between global myocardial ischemia, left ventricular function, myocardial redox state, and high energy phosphate profile. A phosphorous-31 nuclear magnetic resonance study., J Surg Res., 35(4): 332-339 (1983).

ZWEIER JL. KUPPUSAMY P. LUTTY GA.: Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues., Proc Natl Acad Sci U S A., 85(11): 4046-4050 (1988).